

CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL E TOXICOLÓGICA DE ESPÉCIES DE PLANTAS SILVESTRES

Análise mineral, antioxidante e de lectinas

Ana Carolina Franco Versos Brígida Branco

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientadora: Investigadora Coordenadora Maria Dalila Paula Silva Lourenço do Espírito Santo

Co-orientadora: Professora Doutora Margarida Gomes Moldão Martins

Co-orientadora: Professora Doutora Ana Cristina Ferreira da Conceição Ribeiro

Júri:

Presidente: Doutora Maria Luísa Lopes de Castro e Brito, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa

Vogais: Doutor Ricardo Manuel Seixas Boavida Ferreira, Professor Catedrático do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Licenciada Maria Dalila Paula Silva Lourenço do Espírito Santo, Investigadora Coordenadora do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Lisboa, 2015

Esta dissertação respeita a ortografia anterior ao actual acordo ortográfico.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a algumas pessoas que contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

À Investigadora Dalila Espírito Santo, pela proposta do tema de trabalho, que sempre me aliciou, pela orientação, interesse, disponibilidade e por todos os ensinamentos transmitidos.

À Professora Doutora Margarida Moldão, pelo apoio, orientação e sugestões dadas ao longo do trabalho.

À Professora Doutora Ana Cristina Ribeiro, por toda a paciência, simpatia, disponibilidade, dedicação e constante motivação, bem como a experiência e conhecimentos que me proporcionou.

Aos meus pais, por tudo o que me proporcionaram, pelo incentivo ao longo do curso e na realização deste trabalho e pela educação que me deram.

Ao meu irmão e avô, por todo o apoio e boa disposição que sempre me deram para me motivar.

À Filipa Moreira, por estar presente na minha vida, por toda a força, ânimo e amizade dada ao longo de todos estes anos.

Ao Ivo Santos, por toda a paciência, ajuda incansável, dedicação, carinho e incentivo nos momentos mais difíceis.

E, por fim, agradeço a todas as pessoas que directa ou indirectamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos, um sincero, **muito obrigada!**

Resumo

Neste trabalho foram estudadas folhas de quatro plantas silvestres (*Rumex crispus* (labaça-crespa), *Sinapis arvensis* (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* (serralha-macia)) com o objectivo de analisar a sua composição mineral, teor de fenóis, capacidade antioxidante e detecção de lectinas (composto antinutricional).

A análise mineral e antioxidante das espécies estudadas foi comparada com plantas cultivadas das mesmas famílias (ruibarbo, nabiças, acelga-comum e alface). As plantas silvestres, por 100 g de parte edível, destacaram-se pelos elevados teores de magnésio (52,70 mg), ferro (2,69 mg) e zinco (0,46 mg). O teor de compostos fenólicos variou entre 891,55 e 105,84 mg EAG/ 100 g de massa seca e as folhas do *Rumex crispus* apresentaram uma capacidade antioxidante mais de três vezes superior às restantes espécies. Todos os extractos, excepto o de *Rumex crispus*, revelaram a presença de lectinas nas folhas sujeitas a tratamento térmico.

Estes resultados sugerem que as folhas de *Rumex crispus* podem ter relevância na indústria alimentar e as lectinas das restantes espécies poderão ter diversas aplicações.

Será necessária uma pesquisa mais alargada, para uma caracterização mais completa destas plantas e das suas utilizações.

Palavras-chave: plantas silvestres; composição mineral; propriedades antioxidantes; lectinas.

Abstract

In the present work, leaves of four wild plants (*Rumex crispus* (curly dock), *Sinapis arvensis* (wild mustard), *Beta maritima* (sea beet) and *Sonchus oleraceus* (sow thistle)) were studied in order to analyse for their mineral composition, phenolic content, antioxidant capacity, and detection of lectins (anti-nutritive compound).

The mineral and antioxidant study of different species was compared with cultivated plants of same family (rhubarb, turnip greens, common chard and lettuce). In wild plants, per 100 g of part edible, the elements most notably were magnesium (52.70 mg), iron (2.69 mg) and zinc (0.46 mg). The phenolic content varied between 891.55 and 105.84 mg GAE/ 100 g dry weight and the leaves of *Rumex crispus* had an antioxidant capacity three times higher than other species. All extracts, except *Rumex crispus*, revealed presence of lectins in leaves subject to thermal treatment.

These results suggest that leaves of *Rumex crispus* may have potential in the food industry and the lectins of other species could have various applications.

Further research is needed for a more complete characterization these plants and its uses.

Key-words: wild plants; mineral composition; antioxidant properties; lectins.

Extended Abstract

Nowadays, for the vast majority of the urban population, the edible wild plants seem to be of secondary importance as a resource for human nutrition. The changes in patterns of wild plant use differ by region and are associated with lifestyle changes, urbanization, large-scale farming, lesser contact with nature and many other reasons. However several wild plant species are still consumed as traditional food in many regions along with cultivated vegetables in different recipes. Therefore along the years, wild plants have played an important role in complementing staple foods to provide a balanced diet by supplying mineral elements and antioxidant compounds.

The aim this work was study in leaves of four wild plants (*Rumex crispus* (curly dock), *Sinapis arvensis* (wild mustard), *Beta maritima* (sea beet) and *Sonchus oleraceus* (sow thistle)) the nutritional level (mineral elements composition and bioactive compounds (antioxidants)) and toxicological level (presence or absence of lectins).

The mineral elements are essentials to growth and in several biological processes. The antioxidants are important components because they protect against free radicals, such as reactive oxygen species in the human body that are known to be the major contributors in degenerative diseases. The lectins are (glyco)proteins of non-immune origin that binding specifically carbohydrate and that they can cause cells agglutination and precipitation of glycoprotein or carbohydrate. Today, most of plant lectins become a set of important tools for glycobiology and they takes also advantages in immunology, histochemistry, pathology, and physiology areas. On the other hand, consuming this anti-nutritive compound also may cause adverse effects, such as severe intestinal damage disrupting digestion causing nutrient deficiencies and they can bind to erythrocytes, consequently causing hemagglutination and anemia.

For this work, fresh leaves of *Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* and *Sonchus oleraceus* were collected from untilled ground of Tapada da Ajuda, Lisbon. The mineral elements, phosphorus, sodium, potassium, calcium, magnesium, iron, copper, zinc and manganese were determinated by atomic absorption spectrophotometry. Samples were digested by dry-ashing and dissolved in nitric acid (50% v/v). For antioxidant analysis, samples were washed, dried and stored at -18 °C in darkness. The total phenolic contents of the methanolic extracts were determinated using the Folin-Ciocalteu reagent. The 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and ferric reducing antioxidant power (FRAP) were methods used for antioxidant activity determination. The detection of lectins involved the determination of protein concentration by Bradford assay, polypeptidic characterizations, proteomic analysis and

hemagglutination assays. For all methods of detection of lectins, except the two latter, was evaluated for each specie three extracts of leaves (raw, cooked 15 min and cooked 30 min).

The results showed that leaves of different samples contained 80.23 – 88.36% moisture and 1.58 – 2.45% ash. Mineral content of different species was comparable with common cultivated vegetables. In that case, the curly dock (*Rumex crispus*) and wild mustard (*Sinapis arvensis*) compared with rhubarb and turnip greens, respectively, showed higher values of phosphorus, sodium, potassium, magnesium, iron and zinc. Sea beet (*Beta maritima*) compared with common chard showed that elements most notably were sodium, magnesium and iron. Sow thistle (*Sonchus oleraceus*) compared with lettuce had higher values of phosphorus, sodium, iron and zinc. In plants studied was found that *Rumex crispus* showed a high quantity of phenolic compounds followed by *Beta maritima*. *Sinapis arvensis* and *Sonchus oleraceus* had similar value and lower than the species mentioned above. Antioxidant activity in *Rumex crispus* was higher than in other species. The polypeptidic characterizations showed different profiles. In all samples, the extracts of cooked leaves for 15 and 30 min had identical profile therefore to cook these plants during this interval times the result is same. The proteomic analysis was different in four species. The hemagglutination activity showed that extracts cooked leaves of *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* and *Sonchus oleraceus* had presence lectins but extracts of *Rumex crispus* had absence this anti-nutritive compound.

This study revealed that the leaves of these plants had a good mineral content and, relatively high antioxidant capacity. However, the presence of lectins is a negative factor for the alimentation. Nevertheless, these results translate into a new application of that species as an important reservoir for the study of lectins, and its inhibitors, at low cost and with high-yield of extraction, making these species promising in the purification of new lectins and in agriculture application, biotechnology and medical application (neurodegenerative disease, and antitumor activity). This way, the results showed that *Rumex crispus* will have great potential for use as a horticultural item and in the food industry as rich source in mineral elements and natural antioxidant. However further research is needed for a more complete characterization these plants.

Key-words: wild plants; mineral composition; antioxidant properties; lectins.

Índice Geral

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Extended Abstract	vi
Lista de Figuras	x
Lista de Tabelas	xii
Abreviaturas.....	xiii
Introdução e objectivos	1
Enquadramento Teórico	2
1. Consumo de plantas silvestres	2
2. Caracterização botânica das plantas em estudo.....	4
3. Usos alimentares e medicinais das plantas em estudo	7
4. Propriedades antioxidantes.....	8
4.1. Compostos fenólicos	8
4.2. Capacidade antioxidante	11
5. Propriedades nutricionais.....	13
6. Propriedades antinutricionais	15
7. Lectinas	16
7.1. Localização e biossíntese	17
7.2. Mecanismo de acção.....	17
7.3. Classificação.....	18
7.4. Funções e aplicações.....	19
Desenvolvimento Experimental.....	22
8. Materiais	22
8.1. Selecção, colheita e preparação de amostras.....	22
8.2. Reagentes	22
9. Métodos	23
9.1. Determinação do teor de humidade, cinza e minerais	23
9.2. Análise das propriedades antioxidantes	24
9.2.1. Determinação do teor de compostos fenólicos.....	24
9.2.2. Procedimento de extracção para determinação da actividade antioxidante...	24
9.2.3. Determinação da captação de radicais DPPH	25
9.2.4. Determinação do poder redutor	25
9.3. Análise de lectinas.....	26
9.3.1. Procedimento de extracção proteica	26
9.3.2. Determinação do teor proteico	27
9.3.3. Electroforeses SDS-PAGE.....	27
9.3.4. Análise bidimensional de proteínas	28

9.3.5. Detecção de polipéptidos no gel	30
9.3.5.1. Coloração com nitrato de prata	30
9.3.5.2. Coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250	30
9.3.5.3. Secagem dos géis	31
9.3.6. Imobilização de polipéptidos em membrana de nitrocelulose para glicodetecção... ..	31
9.3.7. Determinação da actividade hemaglutinante.....	33
9.3.7.1. Preparação da solução de eritrócitos de coelho a 4% (v/v)	33
9.3.7.2. Ensaio de hemaglutinação	33
9.3.7.3. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares .	34
9.5. Análise estatística.....	35
10. Resultados e Discussão.....	36
10.1. Micronutrientes	36
10.2. Teor de compostos fenólicos e actividade antioxidante	40
10.3. Análise de lectinas.....	42
10.3.1. Caracterização polipeptídica das diferentes espécies estudadas: <i>Rumex crispus</i> , <i>Sinapis arvensis</i> , <i>Beta maritima</i> e <i>Sonchus oleraceus</i>	42
10.3.1.1. Determinação da concentração proteica dos extractos	42
10.3.1.2. Avaliação do perfil polipeptídico e análise proteómica dos extractos crus.....	43
10.3.1.3. Avaliação do perfil polipeptídico das espécies em estudo quando sujeitas às condições usuais na confecção de sopas tradicionais	47
10.3.2. Glicodetecção	51
10.3.3. Avaliação da actividade de lectina das espécies em estudo	54
10.3.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante.....	54
10.3.3.2. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares	58
11. Conclusões	60
Referências bibliográficas	62
Anexos	73

Lista de Figuras

Figura 1. Exemplar de <i>Rumex crispus</i>	4
Figura 2. Exemplar de <i>Sinapis arvensis</i>	5
Figura 3. Exemplar de <i>Beta maritima</i>	6
Figura 4. Exemplar de <i>Sonchus oleraceus</i>	7
Figura 5. Biossíntese de compostos fenólicos.....	9
Figura 6. Reacção de redução do ferro pelo método FRAP.....	13
Figura 7. Representação do mecanismo de acção e da diversidade funcional das lectinas.....	18
Figura 8. Classificação das lectinas relativamente à sua estrutura.....	19
Figura 9. Composição mineral de <i>Rumex crispus</i> e <i>Rheum rhabarbarum</i>	38
Figura 10. Composição mineral de <i>Sinapis arvensis</i> e <i>Brassica napus</i>	38
Figura 11. Composição mineral de <i>Beta maritima</i> e <i>Beta vulgaris</i>	39
Figura 12. Composição mineral de <i>Sonchus oleraceus</i> e <i>Lactuca sativa</i>	39
Figura 13. Comparação da actividade antioxidante pelo método FRAP entre as plantas silvestres e os produtos hortícolas comuns.....	41
Figura 14. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de <i>Rumex crispus</i>	44
Figura 15. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de <i>Sinapis arvensis</i>	45
Figura 16. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de <i>Beta maritima</i>	46
Figura 17. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de <i>Sonchus oleraceus</i>	47
Figura 18. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de <i>Rumex crispus</i> , correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.....	48
Figura 19. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de <i>Sinapis arvensis</i> , correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.....	49
Figura 20. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de <i>Beta maritima</i> , correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.....	50
Figura 21. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de <i>Sonchus oleraceus</i> , correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.....	51
Figura 22. Transferência polipeptídica para detecção de glicoproteínas dos extractos proteicos das folhas cruas de <i>Rumex crispus</i> (R), <i>Sinapis arvensis</i> (SI), <i>Beta maritima</i> (B) e <i>Sonchus oleraceus</i> (SO).....	52
Figura 23. Transferência polipeptídica para detecção de glicoproteínas dos extractos proteicos das folhas sujeitas a +100 °C, durante 30 min, de <i>Rumex crispus</i> (R), <i>Sinapis arvensis</i> (SI), <i>Beta maritima</i> (B) e <i>Sonchus oleraceus</i> (SO).....	53
Figura 24. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de <i>Rumex crispus</i>	54
Figura 25. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de <i>Sinapis arvensis</i>	55
Figura 26. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de <i>Beta maritima</i>	56
Figura 27. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de <i>Sonchus oleraceus</i>	57
Figura 28. Identificação dos açúcares que inibem a actividade hemaglutinante dos extractos das folhas (<i>Sinapis arvensis</i> , <i>Beta maritima</i> e <i>Sonchus oleraceus</i>), sujeitas a +100 °C durante 30 min.....	59
Figura 29. Curvas de calibração para determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	73
Figura 30. Curva de calibração para determinação da actividade antioxidante pela capacidade de captação de radicais DPPH.....	73
Figura 31. Curva de calibração para determinação da actividade antioxidante pelo método do poder redutor.....	74

Figura 32. Curva de calibração para a determinação da concentração proteica dos extractos crus.....	75
Figura 33. Curva de calibração para determinação da concentração proteica dos extractos sujeitos a +100 °C.....	75

Lista de Tabelas

Tabela 1. Aplicações das lectinas em diferentes áreas.	20
Tabela 2. Teores de humidade, cinza e minerais nas folhas das quatro espécies estudadas (média \pm desvio-padrão, n=3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05).	36
Tabela 3. Teores de humidade e cinza das folhas das espécies estudadas (<i>Rumex crispus</i> (labaça-crespa), <i>Sinapis arvensis</i> (mostarda-dos-campos), <i>Beta maritima</i> (acelga-brava) e <i>Sonchus oleraceus</i> (serralha-macia)) e das espécies comuns comparativas (<i>Rheum rhabarbarum</i> (ruibarbo), <i>Brassica napus</i> (nabiças), <i>Beta vulgaris</i> (acelga-comum) e <i>Lactuca sativa</i> (alface)).....	37
Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais e actividade antioxidante (média \pm desvio-padrão, n=3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05).	40
Tabela 5. Avaliação do teor proteico (g/ 100 g de massa fresca) das espécies em estudo, realizado em diferentes condições de tempo e temperatura.	42
Tabela 6. Determinação da actividade hemaglutinante para os diferentes extractos proteicos estudados, após 30 min à temperatura de ebulição.	57

Abreviaturas

2D	Segunda dimensão
ATP	Adenosina-trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
c.m.i.	Concentração mínima inibitória
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
DTT	Ditiotreitol
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EDTA	Ácido etilenodiaminatetracético
FRAP	Poder antioxidante por redução do ião férrico
IEF	Focagem isoelétrica
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
PSA	Persulfato de amoníaco
RNS	Espécies reactivas de azoto
ROS	Espécies reactivas de oxigénio
RSA	Actividade captadora de radicais
SDS	Dodecilo sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS
SDS-PAGE-NR	Electroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e em condições não redutoras
SDS-PAGE-R	Electroforese em gel de poliacrilamida, na presença de SDS e em condições redutoras
TCA	Ácido tricloroacético
TEAC	Capacidade antioxidante em equivalentes de Trolox
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetrametilenodiamina
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
U.H.	Unidade hemaglutinante

Introdução e objectivos

A utilização de plantas silvestres comestíveis tem diminuído devido às alterações dos hábitos alimentares e à perda do saber tradicional de identificação destas espécies, apesar do seu consumo permitir uma maior diversificação e criatividade gastronómica contribuindo para uma maior ingestão de produtos hortícolas. A sua aquisição pode revelar-se muito mais económica em relação aos produtos hortícolas comercializados no supermercado e relativamente à sua produção, estas plantas não estão sujeitas à adição de produtos fitofarmacêuticos.

O estudo destas matérias-primas tem sido um tema com uma importância crescente devido às suas propriedades nutricionais e funcionais, verificando-se um maior interesse numa alimentação com benefícios para a saúde. A utilização destas plantas pode constituir uma fonte de compostos com propriedades bioactivas e que conduzam à inovação e desenvolvimento de novos produtos na área alimentar.

Por estas razões, no presente trabalho, estudaram-se as folhas de quatro espécies silvestres: *Rumex crispus* (labaça-crespa), *Sinapis arvensis* (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* (serralha-macia). Tendo como principais objectivos analisar a nível nutricional a composição de micronutrientes e compostos bioactivos com propriedades antioxidantes, e a nível toxicológico a detecção da presença de lectinas.

Enquadramento Teórico

1. Consumo de plantas silvestres

Nos últimos anos, o crescente interesse relativamente a plantas silvestres comestíveis, sobretudo na Europa, tem levado a vários estudos etnobotânicos. Este facto deve-se à utilização destas plantas como alimentos tradicionais, à sua relação com o clima e o solo onde se desenvolvem espécies específicas de determinados locais, ao património cultural imaterial e ao potencial destes alimentos como nutracêuticos (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005; Ghirardini *et al.*, 2007).

Para muitos povos, as plantas silvestres são bastante importantes pois funcionam como um complemento na dieta, proporcionando uma alimentação diversificada e sendo uma fonte de vitaminas e minerais. Estas plantas têm um bom valor nutritivo, são facilmente colhidas e as pessoas que as consomem gostam do seu sabor, podendo desfrutar das diferentes combinações possíveis, consoante a sua sazonalidade (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005).

Há vários registos globais de plantas silvestres comestíveis em todo o mundo, incluindo sementes, raízes, inflorescências, frutos, caules e folhas, que são consumidas cruas ou cozinhadas, como aperitivos, bebidas, temperos, sopas, saladas e como acompanhamento de pratos principais (Della *et al.*, 2006; Kalle e Sõukand, 2012; Liopa-Tsakalidi, 2014).

Nos últimos anos, estas plantas têm sido consideradas alimentos associados a épocas de escassez e, na Península Ibérica, são muitas vezes consideradas como alimentos alusivos a tempos de crise, com uma importância secundária para a alimentação humana e um desenvolvimento muito demorado e sazonal. Por estes motivos, têm-se tornado preferíveis os produtos hortícolas cultivados e comercializados que, devido ao avanço tecnológico agrícola e industrial estão acessíveis tanto nos grandes centros populacionais como nas zonas mais distantes, encontrando-se em grande quantidade, mesmo fora das épocas normais de cultivo (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005; Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007; Kalle e Sõukand, 2012; Luczaj *et al.*, 2012).

Nas populações rurais de Portugal e Espanha, a mudança dos estilos de vida, a crescente urbanização, a agricultura em larga escala e o contacto, cada vez menor, com a natureza faz com que as pessoas simplesmente não saibam reconhecer as plantas silvestres comestíveis, resultando deste modo no desaparecimento da sua utilização. Assim, os estudos etnobotânicos destas espécies não são simples, porque o conhecimento tradicional encontra-se associado à geração mais idosa que ainda

mantém esses saberes e utiliza estas plantas, verificando-se uma ausência de transmissão de informação geracional que conduz ao desaparecimento dos conhecimentos e costumes relacionados com a exploração e gestão da maioria dos recursos silvestres (Ghirardini *et al.*, 2007; Kalle e Sõukand, 2012; Luczaj *et al.*, 2012). Portanto, antes que desapareçam por completo, é importante o estudo destes elementos da diversidade biocultural (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007).

Embora a tradição culinária com plantas silvestres tenha diminuído, a sua utilização contemporânea tem sido documentada em vários países mediterrânicos (Liopa-Tsakalidi, 2014). A tradição de comer plantas silvestres apesar de ter diminuído drasticamente não desapareceu por completo, e muitos estudos têm revelado os seus benefícios nutricionais e funcionais (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007; Luczaj *et al.*, 2012). Em alguns países europeus, com a aculturação e a globalização tem-se observado um crescente interesse sobre estas plantas, tendo sido feita uma reavaliação de identidades e tradições locais, incluindo pratos tradicionais com a utilização destas plantas pouco valorizadas (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005; Ghirardini *et al.*, 2007).

Hoje em dia, o interesse dos *chefs* na oferta de novos sabores e pratos pode desempenhar um papel crucial na promoção social destes recursos, pois estes envolvem o conhecimento e a criatividade na sua utilização e a população gosta de experimentar novidades gastronómicas. Assim, esta pode ser uma área que permite explorar plantas que já foram usadas no passado, elaborando receitas que envolvam a mistura de várias espécies silvestres de forma a diversificar as actuais refeições. Mais recentemente, a importância dada à qualidade dos produtos hortícolas adquiridos em grandes superfícies comerciais e a produtos de agricultura biológica tem aumentado o interesse por este tipo de plantas, estando estas a ser promovidas pela comunicação social a nível culinário e, conseqüentemente, em relação aos seus benefícios para a saúde (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005; Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007; Luczaj *et al.*, 2012).

Apesar deste interesse crescente pelas plantas silvestres é importante salientar que a maneira como as pessoas percebem e usam os seus recursos desempenha um papel importante na sua conservação, que caso não seja bem-feita pode levar a resultados imprevisíveis no seu desenvolvimento sustentável (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2005; Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007).

2. Caracterização botânica das plantas em estudo

No contexto deste trabalho, a designação de plantas silvestres refere-se a plantas que se desenvolvem espontaneamente sem um cultivo intencional.

O ***Rumex crispus* L.**, também conhecido como labaga-crespa, labaga, cata-cuz ou regalo-da-horta (Rocha, 1996), é uma planta vivaz, da família *Polygonaceae* e com um sistema radicular muito desenvolvido. Apresenta um caule de 30 a 150 cm, erecto, simples ou ramificado e de cor verde ou avermelhado. As suas primeiras folhas são oblongo-lanceoladas, as folhas basais geralmente pecioladas são oblongo-lanceoladas, agudas no ápice, na base subtruncadas ou atenuadas e com uma margem ondulado-crespa. Por último, as folhas superiores são mais pequenas, lanceoladas e subsésseis e também onduladas na margem. A sua inflorescência apresenta ramificações geralmente erectas e densas. Relativamente ao fruto, este é obovóide-triquetro com três faces castanho-escuras e lisas. A núcula encontra-se inclusa por três valvas inteiras ou raramente denticuladas na base, cordiformes de 3,5 a 6 mm e com uma calosidade por cada valva verificando-se geralmente uma calosidade maior que as restantes (**Figura 1**) (Moreira *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2000; Yildirim *et al.*, 2001; Valagão, 2006; Flora-on; Jardim Botânico da UTAD).

Esta é uma planta que se pode encontrar em locais incultos ou bem irrigados e em altitudes até 2300 metros acima do nível do mar. A plântula é cultivada na Primavera e utilizada para consumo, como um produto hortícola, e a semente é cultivada no Verão e utilizada, em alguns países, para medicina popular (Yildirim *et al.*, 2001; Jardim Botânico da UTAD).



Figura 1. Exemplar de *Rumex crispus*.

A ***Sinapis arvensis* L.**, vulgarmente conhecida como mostarda-dos-campos, mostarda-brava, saramago-bravo, ineixas ou granza-dos-campos (Rocha, 1996), faz

parte da família *Brassicaceae*, é uma planta anual, um tanto hispida, podendo atingir até 80 cm de altura. O caule é ramoso e na base apresenta sedas ásperas. As folhas inferiores são lirado-penafendidas com 2-3 pares de segmentos na parte basilar e com pecíolo, enquanto as superiores são lanceoladas sem pecíolo e dentadas. As inflorescências são cachos que possuem 20-60 flores com pedicelos de 3 a 5 mm, um pouco mais compridos na época de frutificação, as flores são geralmente de pétalas amarelas com 9-10 mm. Os frutos por lóculo possuem 8-13 sementes redondas de 1-2,5 mm com uma coloração avermelhada ou anegrada, e o rostro recto e cónico com uma ou duas sementes e menor que as valvas (12-35 mm) (**Figura 2**) (Mulligan e Bailey, 1975; Moreira *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2000; Luzuriaga *et al.*, 2006; Jardim Botânico da UTAD).

Esta é uma espécie ruderal (bermas de caminhos e espaços similares) que se pode encontrar em terrenos nitrados. A *Sinapis arvensis* L. é por vezes confundida com outras espécies de flor amarela, tais como a *Sinapis alba* L. (mostarda-branca), *Brassica nigra* (L.) Kosh (mostarda-preta), *Brassica juncea* (L.) Czern (mostarda-indiana), *Brassica campestris* L. (nabo-silvestre-cultivado), *Brassica napus* L. (couve-nabiça-cultivada) e *Raphanus raphanistrum* L. (rabanete-silvestre), contudo, a *Sinapis arvensis* distingue-se de todas as anteriores por ter no rostro do fruto a semente e este não ser achatado, ao contrário da *Sinapis alba* que tem o rostro achatado e não tem sementes (Mulligan e Bailey, 1975; Luzuriaga *et al.*, 2006; Jardim Botânico da UTAD).



Figura 2. Exemplar de *Sinapis arvensis*.

A ***Beta maritima* L.**, também designada por acelga-brava (Rocha, 1996), pertence à família *Chenopodiaceae*, é uma planta sem pêlos, de desenvolvimento anual ou bienal e pode atingir até 2 metros de altura. As folhas são ovado-rombóides, podem ter um comprimento até 12 cm e as suas margens são onduladas, sendo as folhas inferiores pecioladas ao contrário das superiores que praticamente não apresentam pecíolo. A inflorescência, na parte superior é espiciforme com 1-8 flores em glomérulos

auxiliares sem brácteas e, na parte inferior, é de perianto de cinco segmentos unidos. O fruto encontra-se concrescente com os segmentos do perianto (**Figura 3**) (Moreira *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2000; Jardim Botânico da UTAD).

Trata-se de uma planta que se pode encontrar em terrenos incultos, sapais, nas arribas costeiras e, com menos frequência, em dunas ou em terrenos salinos margosos e ruderalizados. A *Beta maritima* pode por vezes confundir-se com a *Patellifolia patellaris* sendo a sua distinção feita pelo fruto, pois na *Beta maritima* os frutos estão ligados dois a dois pela base, enquanto na *Patellifolia patellaris* os frutos estão totalmente livres, não sendo unidos entre si (Flora-on; Jardim Botânico da UTAD).



Figura 3. Exemplar de *Beta maritima*.

O ***Sonchus oleraceus* L.** que é mais conhecido por serralha-macia, serralha, serralha-branca, serralha-macia-de-folha-larga, serralha-mansa, leitaruga ou leitugas (Rocha, 1996), é uma espécie da família *Asteraceae*. Esta é uma planta anual ou bienal, inerte, com um desenvolvimento de 10 a 140 cm e com um caule erecto, oco, simples ou ramoso e que frequentemente possui glândulas com pedicelo na parte superior e na base dos capítulos, enquanto na parte superior dos pedúnculos apresenta um branco-tomentoso. As folhas inferiores são roncínado-penatissectas com o segmento terminal triangular, moles e de pecíolo alado, sendo que as folhas superiores não têm um recorte profundo nem pecíolo mas têm aurículas amplexicaules. Na inflorescência verificam-se capítulos com involúcro de 27 a 35 brácteas e flores liguladas amarelo vivo com limbo de igual comprimento do tubo. Em relação ao fruto, as cípselas são ligeiramente planas, não aladas e com rugosidades transversais entre as costas possuindo papilhos de 5-8 mm variavelmente persistentes (**Figura 4**) (Moreira *et al.*, 2000; Vasconcelos *et al.*, 2000; Jardim Botânico da UTAD).

Esta é uma planta ruderal (bermas de caminhos e espaços similares) que se desenvolve em terrenos de cultivo, hortas, jardins mas também em habitats naturais. Tendo em conta que esta é uma planta idêntica ao *Sonchus tenerrimus*, para ocorrer a

sua distinção deve ter-se uma especial atenção à divisão das folhas, pois no *Sonchus oleraceus* as folhas não são contraídas na base, em oposto, às folhas do *Sonchus tenerrimus* que têm uma acentuada contração na base (Flora-on; Jardim Botânico da UTAD).



Figura 4. Exemplar de *Sonchus oleraceus*.

3. Usos alimentares e medicinais das plantas em estudo

Desde sempre, as plantas silvestres foram utilizadas pelo Homem como recurso alimentar, servindo de complemento à caça. Posteriormente, com o conhecimento das suas características e propriedades começaram também a ser usadas selectivamente com finalidades medicinais. Apesar das diferentes espécies de plantas terem diversos usos e formas de consumo, dependendo dos países ou das regiões onde se encontram, é comum a sua utilização tanto pelas suas características organolépticas como pelas suas propriedades funcionais e medicinais (Dogan *et al.*, 2004; Valagão, 2006; Abbasi *et al.*, 2013; Guil-Guerrero, 2014).

Relativamente ao *Rumex crispus*, a sua utilização é idêntica à dos outros produtos hortícolas comuns, no entanto antes da sua preparação as folhas devem ser previamente escaldadas em água fervente para perderem o seu sabor azedo. A nível alimentar, consomem-se as folhas basais cozidas que podem ser utilizadas para fazer molhos, como condimento, em recheios, tartes ou sopas (Pieroni, 2000; Dogan *et al.*, 2004; Tardío *et al.*, 2006; Valagão, 2006; Lentini e Venza, 2007). A nível funcional, esta planta está relacionada com propriedades diuréticas, emolientes e de purificação do sangue devido à sua acção estimulante do aparelho urinário, das funções intestinais e hepáticas (Valagão, 2006). As folhas frescas desta planta têm também uma aplicação

tópica na medicina popular para tratamento de furúnculos, feridas, queimaduras e inflamações da pele (Pieroni, 2000; Scherrer *et al.*, 2005).

As folhas da *Sinapis arvensis* são consumidas fritas salteadas em azeite, como acompanhamento de pratos de carne, em omeletes e sopas (Dogan *et al.*, 2004; Lentini e Venza, 2007). As suas propriedades medicinais são focadas no tratamento de dores reumáticas aplicando, nas partes doridas e inflamadas do corpo, uma massa pastosa resultante das folhas e ramos da *Sinapis arvensis*. As sementes desta planta têm também um uso terapêutico para tratamento da tosse e do reumatismo, enquanto as raízes são utilizadas para as dores de estômago, sendo ambas aplicadas por decocção (Genç e Özhatay, 2006).

As formas mais comuns de se consumir as folhas de *Beta maritima* são estufando, cozendo, salteando em azeite, como acompanhamento de pratos de carne, em omeletes, recheios, tartes e sopas (Pieroni, 2000; Tardío *et al.*, 2006; Lentini e Venza, 2007). Também é considerada uma planta medicinal sendo recomendado o seu consumo para distúrbios digestivos, no tratamento e prevenção de obstipação, em queimaduras, dores de garganta e anemia (Pieroni, 2000; Lentini e Venza, 2007; Morales *et al.*, 2014).

Relativamente ao *Sonchus oleraceus*, geralmente consomem-se os talos tenros e as folhas basais que podem ser cozidas, estufadas, assadas, cruas em saladas, fritas salteadas em azeite, como acompanhamento de pratos de carne, em omeletes, tartes e sopas (Dogan *et al.*, 2004; Tardío *et al.*, 2006; Lentini e Venza, 2007). Esta planta é utilizada terapeuticamente como depurativo e diurético, mas também em contusões, queimaduras e para evitar hemorroidas (Morales *et al.*, 2014).

As diversas aplicações das plantas acima mencionadas são bastante importantes para as populações, por este motivo, em estudos etnobotânicos sobre plantas silvestres comestíveis são frequentemente mencionadas as suas propriedades nutricionais e os seus usos medicinais (Pieroni *et al.*, 2002; Dogan *et al.*, 2004).

4. Propriedades antioxidantes

4.1. Compostos fenólicos

Em estudos epidemiológicos tem aumentado o interesse da comunidade científica sobre antioxidantes naturais presentes em hortofrutícolas, uma vez que o consumo equilibrado destes está associado a uma promoção para a saúde e a uma

redução do risco de doenças crónicas como doenças cardiovasculares, cancro, aterosclerose ou doenças inflamatórias. Os efeitos protectores dos antioxidantes naturais resultam principalmente de três grandes grupos de compostos: as vitaminas, os carotenoides e os compostos fenólicos, que no contexto deste trabalho são os mais destacados (Pyo *et al.*, 2004; Thaipong *et al.*, 2006; Cartea *et al.*, 2011; Wegiera *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários e alguns apresentam actividade antioxidante, uma vez que, as suas propriedades redox permitem-lhes actuar como agentes redutores, dadores de átomos de hidrogénio e quelantes de singletos de oxigénio (Dudonné *et al.*, 2009; Ignat *et al.*, 2011; Wegiera *et al.* 2011; Proestos *et al.*, 2013; Tabaraki e Ghadiri, 2013). Os principais grupos dos compostos fenólicos com propriedades antioxidantes são os flavonóides, os taninos, os ácidos fenólicos, as chalconas e as cumarinas. Estes compostos apresentam diferentes funções nas plantas e a sua biossíntese é resultante das vias do chiquimato e do acetato-malonato (**Figura 5**) (Silva *et al.*, 2007; Belitz *et al.*, 2009; Cartea *et al.*, 2011; Caroch e Ferreira, 2013; Batosz, 2014)

Os últimos estudos têm mostrado que os polifenóis de origem vegetal são antioxidantes bastante eficazes, no entanto, o seu conteúdo é afectado por factores bióticos (ataques de insectos e infecções de agentes patogénicos) e abióticos (luz, temperatura, nutrientes, disponibilidade de água, condições de crescimento e radiação exposta), bem como pelas condições de armazenamento e tratamento pós-colheita. Assim, devido a todos estes factores, dependendo das espécies e das condições em que estão inseridas, as concentrações finais de polifenóis nos tecidos das plantas são variáveis (Pyo *et al.*, 2004; Belitz *et al.*, 2009; Cartea *et al.*, 2011).

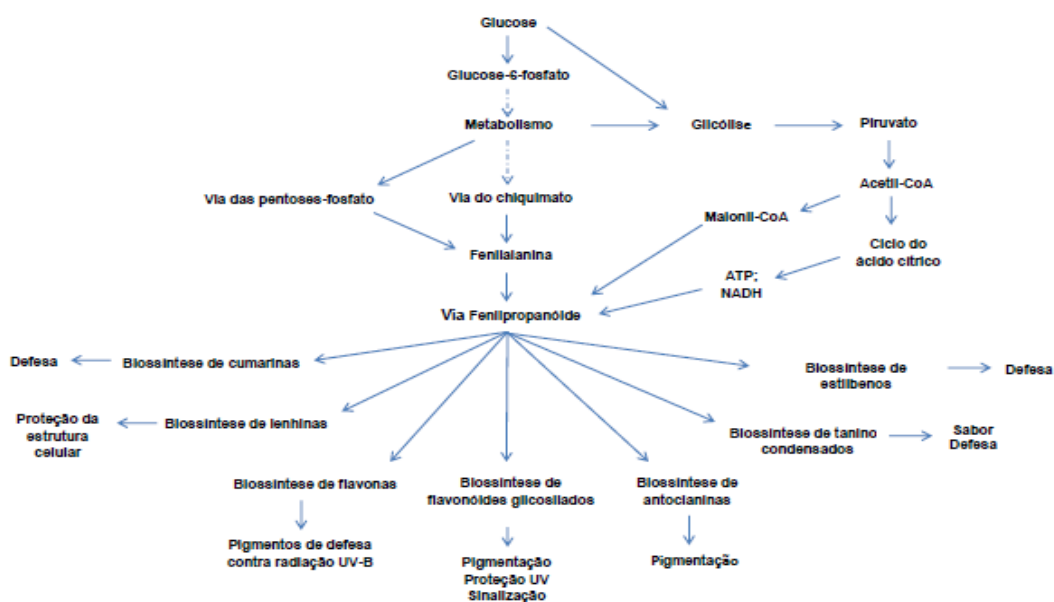
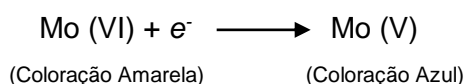


Figura 5. Biossíntese de compostos fenólicos.
(Adaptada de: Shetty *et al.*, 2006)

A presença de antioxidantes num substrato oxidável é essencial para atrasar significativamente ou inibir a oxidação do referido substrato (Carocho e Ferreira, 2013). Na indústria alimentar, os antioxidantes são substâncias bastante utilizadas para prolongar o tempo de vida útil dos produtos. Paralelamente, estudos epidemiológicos revelam que o consumo equilibrado de antioxidantes naturais, como os polifenóis, são benéficos para a saúde (Tabaraki e Ghadiri, 2013). Contudo, os antioxidantes sintéticos utilizados como butil-hidroxianisol (BHA) e o butil-hidroxitolueno (BHT) classificados como E-320 e E-321, respectivamente, são muito voláteis e termolábeis provocando problemas a nível de segurança alimentar devido à sua possível absorção e acumulação nos órgãos e tecidos do organismo. Por este motivo, a investigação e identificação de antioxidantes naturais é essencial para que possam ser aplicados tanto na indústria alimentar, como na formulação de nutracêuticos que podem ajudar a prevenir os problemas oxidativos que ocorrem no organismo (Smith e Hong-Shum, 2003; Dudonné *et al.*, 2009; Carocho e Ferreira, 2013; Tabaraki e Ghadiri, 2013).

Na determinação destes compostos o método mais utilizado envolve o reagente de Folin-Ciocalteu que é uma mistura de tungsténio e molibdénio com uma cor amarela. Neste método, os compostos fenólicos, em meio alcalino, são oxidados pelo reagente de Folin-Ciocalteu. O centro de molibdénio do reagente é reduzido de Mo(VI) a Mo(V) devido a um electrão que é doado por um antioxidante, formando-se complexos azuis passíveis de monitorização espectrofotométrica com um valor máximo de absorvância a 765 nm (Sim *et al.*, 2010; Berker *et al.*, 2013; Carocho e Ferreira, 2013; Tabaraki e Ghadiri, 2013).



O método foi inicialmente aplicado para a análise de proteínas, havendo uma actividade do reagente com proteínas com resíduos de tirosina (contendo um grupo fenol). Muito mais tarde Singleton e Rossi (1965) aplicaram este método para a análise de fenóis em vinho e, actualmente, é uma técnica amplamente utilizada em diversas matrizes alimentares para a determinação de compostos fenólicos totais. Trata-se de um método simples, rápido, fiável e que não requer equipamento especializado. No entanto, este método apresenta algumas limitações, uma vez que, o reagente de Folin-Ciocalteu não é específico para compostos fenólicos, podendo ser reduzido por outros compostos não fenólicos, como determinados aminoácidos ou o ácido ascórbico (Berker *et al.*, 2013). Contudo, é frequentemente aplicado em laboratórios de pesquisa para testes a antioxidantes de alimentos e extractos vegetais, mas para uma maior viabilidade dos resultados deveriam complementar-se os ensaios das técnicas

espectrofotométricas com outras técnicas como espectrometria de massa ou ressonância magnética nuclear (Berker *et al.*, 2013; Carochio e Ferreira, 2013; Acosta-Estrada *et al.*, 2014).

4.2. Capacidade antioxidante

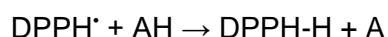
Em organismos aeróbios, os compostos oxidantes também designados de radicais livres são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula, na maior parte sob a forma de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS). Para evitar os danos provocados por estas espécies, altamente instáveis e activas em reacções químicas com outras moléculas, são utilizados vários mecanismos de defesa, um dos quais é a actividade de compostos antioxidantes (Michalak, 2006; Ferreira e Abreu, 2007; Brewer, 2011; Vladimir-Knežević *et al.*, 2012).

Um antioxidante é uma molécula estável que, na presença de um radical livre, actua como um dador de electrões, dador de hidrogénio ou como quelante de singletos de oxigénio de modo a retardar ou inibir danos celulares. Assim, os antioxidantes são essenciais para reduzir o stress oxidativo que é um estado de desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor dos oxidantes que levam a danos cumulativos em biomacromoléculas (Dai e Mumper, 2010; Lobo *et al.*, 2010; Carochio e Ferreira, 2013).

O organismo humano é exposto a diferentes pró-oxidantes que provocam lesões celulares podendo levar a alterações no DNA, em proteínas, hidratos de carbono e lípidos, por este motivo, quantidades equilibradas de antioxidantes são muito relevantes devido à sua capacidade de promoção de saúde como anti-mutagénicos, anti-alérgicos e anti-inflamatórios (Stahl e Sies, 2003; Pourmorad *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2011). No entanto, para que o potencial antioxidante dos alimentos se mantenha em condições fisiológicas é necessário, entre outras condições, que estes compostos resistam à digestão gastrointestinal, mecanismo este que ainda permanece pouco conhecido (Seifu *et al.*, 2012). Além disso, tem aumentado a controvérsia em torno da ingestão de compostos antioxidantes, existindo estudos que revelam a existência de um stress redutivo devido a uma ingestão excessiva de antioxidantes que impedem um ligeiro stress oxidativo que permite que os pró-oxidantes exerçam um papel de sinalização celular, benéfico para a defesa celular e para uma diminuição do risco de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (Vladimir-Knežević *et al.*, 2012; Carochio e Ferreira, 2013).

Uma avaliação inicial da actividade antioxidante do extracto de uma planta, envolve geralmente diferentes ensaios *in vitro* baseados em reacções redox.

O ensaio da capacidade de captação de radicais 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) que reagem com doadores de hidrogénio, como os compostos fenólicos, é um dos métodos mais utilizados. O DPPH é um radical estável que na presença de um antioxidante é captado. Deste modo, uma solução de DPPH[•] que, inicialmente apresenta uma coloração roxa, quando em contacto com um antioxidante (AH) fica com uma coloração amarela devido à formação de difenil-picril-hidrazina, verificando-se que com esta reacção há uma diminuição da absorvância a 517 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995; Roginsky e Lissi, 2005; Pourmorad *et al.*, 2006; Sochor *et al.*, 2010; Tabaraki e Ghadiri, 2013).



Portanto, a leitura de absorvância da solução a 517 nm permite calcular a actividade captadora de radicais (RSA). Este é um método simples, rápido e sensível para a determinação da actividade antioxidante de um composto específico ou de extractos de plantas, sendo por isso uma técnica amplamente utilizada. Outra grande vantagem é o facto de o DPPH durante o tempo de reacção (40 min), reagir na totalidade com a amostra, mesmo com antioxidantes fracos (Pourmorad *et al.*, 2006; Marxen *et al.*, 2007; Sousa *et al.*, 2007; Kedare e Singh, 2011; Carocho e Ferreira, 2013). No entanto, esta técnica apresenta algumas limitações como o facto dos resultados poderem ser afectados por alterações do DPPH por acção da luz, do oxigénio, do tipo de solvente ou por existirem outros compostos com absorvância a 517 nm, como os carotenóides (Prior *et al.*, 2005; Kedare e Singh, 2011).

Com o intuito de obter um resultado da actividade antioxidante com uma maior precisão, para além do ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH é também realizado um ensaio da capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC). O ensaio TEAC baseia-se na capacidade de um composto eliminar o radical DPPH estável. Desta forma, a realização destes dois ensaios permite fazer uma relação da variação de absorvância para a curva dose-resposta de um antioxidante padrão, o Trolox (Litescu *et al.*, 2010; Tabaraki e Ghadiri, 2013).

Outro ensaio para determinar a actividade antioxidante é o do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) onde há a redução, a pH baixo, do complexo de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) com o cloreto férrico hexa-hidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) resultando uma solução quase incolor ou ligeiramente acastanhada. Na solução, os compostos antioxidantes da amostra actuam reduzindo o complexo ferrocianeto à forma ferrosa por doarem um electrão (**Figura 6**). Assim, a redução de Fe^{3+} é frequentemente utilizada como um indicador da actividade de dador de electrões, que é um importante

mecanismo de acção antioxidante dos compostos fenólicos. Esta redução dos iões férricos a iões ferrosos leva à formação de complexos com uma coloração azul intensa permitindo a monitorização por espectrofotometria. A determinação da actividade antioxidante é calculada pela diferença da absorvância a 595 nm da solução que contém os iões ferrosos de concentração conhecida, e que está directamente relacionada com o poder antioxidante da amostra na redução do ferro (Rufino *et al.*, 2006; Dudonné *et al.*, 2009; Litescu *et al.*, 2010; Sochor *et al.*, 2010; Tabaraki e Ghadiri, 2013).

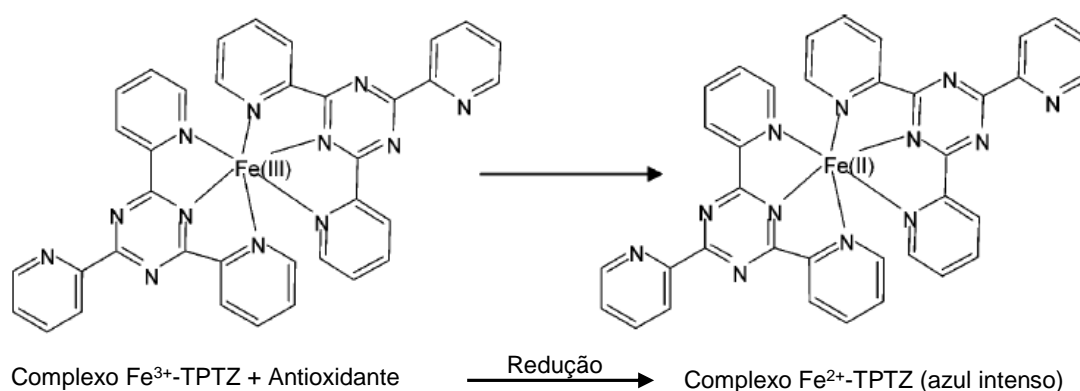


Figura 6. Reacção de redução do ferro pelo método FRAP.
(Adaptada de: Prior *et al.*, 2005)

Este é um método simples, rápido, económico e fiável que não requer equipamento especializado e que permite a acção de antioxidantes tanto em soluções puras como em misturas.

Contudo, existem algumas limitações, tais como, o facto de ser um método que se realiza a valores de pH não fisiológicos (pH 3,6), não é adequado para determinar antioxidantes com grupos oxidáveis (-SH) ou grupos que reajam com o Fe^{2+} e, dependendo do tempo da análise, a reactividade dos antioxidantes pode variar muito ou até inverter-se. Por este motivo, através deste método não se detectam compostos antioxidantes que reajam mais lentamente (Prior *et al.*, 2005; Litescu *et al.*, 2010; Sochor *et al.*, 2010).

5. Propriedades nutricionais

Os nutrientes são definidos como substâncias químicas presentes nos alimentos e necessários para a vida, tendo as funções de crescimento, manutenção e reparação dos tecidos celulares. Os nutrientes podem dividir-se em dois grandes grupos: os macronutrientes (dos quais fazem parte as proteínas, lípidos e hidratos de carbono) e

os micronutrientes (que incluem as vitaminas, os minerais, aminoácidos essenciais e ácidos gordos).

A nutrição é, indiscutivelmente, um factor de extrema importância na promoção e manutenção de uma saúde equilibrada ao longo de todo o ciclo de vida. Por essa razão, a ingestão de todos os nutrientes é essencial, mas deve ser equilibrada e realizada em função das necessidades biológicas do organismo de modo a reduzir a prevalência de diversas doenças (World Health Organization, 2003; Stipanuk e Caudill, 2013).

Os últimos estudos têm provado que para uma dieta saudável a ingestão excessiva de lípidos, principalmente ácidos gordos saturados, de hidratos de carbono e de sal deve ser reduzida e, em contrapartida, deve aumentar-se a ingestão de hortofrutícolas. Actualmente, a evidência científica comprova que o consumo adequado de hortofrutícolas contribui para a prevenção da morte prematura e de diversas doenças crónicas não transmissíveis, tais como, doenças cardiovasculares e cancerígenas, diabetes, obesidade ou osteoporose. Dados da Organização Mundial de Saúde, estimam que o reduzido consumo deste grupo alimentar seja responsável por cerca de 19% dos cancros gastrointestinais, 31% da doença cardiovascular isquémica e por 11% dos enfartes do miocárdio. Por conseguinte, é recomendado um consumo mínimo de 400 g de hortofrutícolas (excluindo batatas e outros tubérculos) por dia (World Health Organization, 2002; World Health Organization, 2003).

Os produtos hortofrutícolas são uma excelente fonte de fibras, vitaminas, minerais e fitonutrientes, muitos deles com actividade antioxidante. As vitaminas são substâncias orgânicas indispensáveis para o organismo estando envolvidas em diversos processos fisiológicos. Os minerais são substâncias inorgânicas e a sua quantidade nos alimentos varia substancialmente, dependendo da concentração com que se encontram na água e no terreno de cultivo onde os hortofrutícolas se desenvolvem. No organismo humano estão naturalmente presentes cerca de 25 minerais. Estes elementos são extremamente importantes para as actividades metabólicas normais, sendo constituintes de todas as células e tecidos. Como o organismo é um sistema dinâmico, se não existir um correcto equilíbrio dos minerais, as vitaminas não podem ser devidamente assimiladas havendo um desequilíbrio geral (Hanif *et al.*, 2006; Kader *et al.*, 2012; Stipanuk e Caudill, 2013).

Relativamente às plantas silvestres comestíveis, em geral, estas possuem uma boa quantidade de nutrientes essenciais, podendo até ser consideradas uma fonte de subsistência segura e que poderá ajudar a reduzir a desnutrição de acordo com os objectivos de desenvolvimento do milénio para a diminuição da pobreza e fome no mundo (Getachew *et al.*, 2013).

6. Propriedades antinutricionais

As plantas silvestres têm sido objecto de vários estudos pelas suas propriedades nutricionais, contudo estas plantas apresentam um alto teor de componentes bioactivos podendo alguns destes serem tóxicos, sendo portanto a determinação destes compostos antinutricionais essencial (Guil *et al.*, 1997; Mithril e Dragsted, 2012). Os compostos antinutricionais estão naturalmente presentes em alguns vegetais, e interferem no processo metabólico normal do organismo provocando a inactivação de certos nutrientes, diminuindo o processo digestivo ou a biodisponibilidade dos nutrientes (Agbaire, 2011; Mahadkar *et al.*, 2012; Gemedede e Ratta, 2014). No entanto, recentes estudos epidemiológicos têm demonstrado que alguns compostos antinutricionais, se forem ingeridos em quantidades adequadas poderão ter um papel benéfico na prevenção de doenças crónicas. Actualmente, os grupos de antinutrientes que se conhecem nas plantas são os taninos, fitatos, oxalatos, saponinas, alcalóides, inibidores de proteases, glicósidos cianogénicos e lectinas (Getachew *et al.*, 2013; Gemedede e Ratta, 2014).

Os taninos são estáveis a temperaturas elevadas e diminuem a digestibilidade proteica, estes compostos presentes nos produtos alimentares inibem a actividade da tripsina, quimotripsina, amilase e lipase, diminuem a qualidade das proteínas dos alimentos e interferem com a absorção do ferro ingerido (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

Os fitatos, encontram-se principalmente em sementes, sendo uma forma de armazenamento de catiões, de grupos fosforilo de elevada energia e por quelarem o ferro livre. Este composto termo estável, como ião com carga altamente negativa, resiste a um amplo espectro de valores de pH, portanto a sua presença na dieta tem um impacto negativo na biodisponibilidade de iões minerais bivalente e trivalentes, tais como Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} e Cu^{2+} (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

Os oxalatos são sais formados por ligações fortes entre o ácido oxálico e minerais, esta combinação química dá origem a complexos solúveis ou insolúveis, dependendo do mineral envolvido. Estes compostos na forma insolúvel, como por exemplo o oxalato de cálcio, têm tendência a precipitar ou solidificar nos rins ou no tracto urinário formando-se cálculos nestes órgãos. Assim, quando ingeridos numa quantidade elevada, tornam os nutrientes inacessíveis ao organismo conduzindo a carências nutricionais e a uma sensibilidade anómala na mucosa intestinal. Uma vez que estes compostos são termo estáveis só podem ser eliminados por lixiviação ou processamento alimentar (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

As saponinas conhecidas como compostos de superfície activa não voláteis devido à sua estrutura complexa, com a presença de uma aglicona lipossolúvel e uma cadeia de açúcares solúvel em água (natureza hidrofílica), apresentam diversas propriedades físicas, químicas e biológicas, tais como propriedades de formação de espumas, emulsionantes, farmacêuticas, médicas, hemolíticas, antimicrobianas e insecticida. Actualmente, estes compostos termo estáveis estão a suscitar um grande interesse devido à sua aplicação na prevenção de diversas doenças (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

Os alcalóides são pequenas moléculas orgânicas termo estáveis com cadeias de vários anéis de carbono e com alguns átomos de carbono substituídos por átomos de azoto. Na natureza, estas substâncias repelem insectos e herbívoros devido ao seu sabor amargo, mas quando ingeridas pelo Homem actuam no sistema nervoso impedindo ou aumentando inapropriadamente a transmissão electroquímica, provocando a ruptura celular das membranas do tracto gastrointestinal (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

A actividade antinutricional dos inibidores de proteases deve-se à sua capacidade de inibição das enzimas proteolíticas no tracto gastrointestinal provocando, com maior evidência, a inibição do crescimento e a hipertrofia do pâncreas. No entanto, estes compostos são termolábeis podendo perder as suas qualidades a determinada temperatura (Wink, 2005; Gemedede e Ratta, 2014).

Os glicósidos cianogénicos são constituídos por uma parte aglicona (α -hidroxinitrilo) e um açúcar (geralmente, a D-glucose). Com o tratamento térmico, estes compostos quando hidrolisados produzem ácido cianídrico que é volátil e tóxico (Gemedede e Ratta, 2014).

Por fim, e com maior destaque no contexto deste trabalho, as lectinas que são proteínas com a capacidade de se ligarem a hidratos de carbono e, nos últimos anos, têm sido intensivamente estudadas devido às suas diversas aplicações a nível biotecnológico e biomédico (Gemedede e Ratta, 2014).

7. Lectinas

As lectinas são (glico)proteínas com a capacidade de reconhecerem e se associarem por ligações de hidrogénio e interacções de Van der Waals, de forma reversível e com elevada afinidade a hidratos de carbono específicos sem, contudo, apresentarem funções catalíticas ou características imunológicas (Lis e Sharon, 1998;

Peumans e Van Damme, 1998; Silva *et al.*, 2010; Karnchanatat, 2012). Estas proteínas são essencialmente conhecidas pela sua capacidade de se ligarem aos hidratos de carbono da superfície dos eritrócitos aglutinando-os. Para realizarem a sua actividade hemaglutinante algumas destas proteínas necessitam dos catiões Ca^{2+} e Mn^{2+} , estando estes associados aos aminoácidos que estabelecem a ligação aos hidratos de carbono (Silva *et al.*, 2010; Lam e Ng, 2011; Karnchanatat, 2012; Gemedede e Ratta, 2014).

7.1. Localização e biossíntese

Actualmente, sabe-se que a distribuição das lectinas é ubíqua. No entanto, as primeiras lectinas foram extraídas de plantas devido ao facto de serem uma matriz com facilidade de extracção e com rendimentos relativamente elevados (Sharon e Lis, 1990; Karnchanatat, 2012; Gemedede e Ratta, 2014). Podem encontrar-se diversas lectinas com diferentes bioactividades tanto em plantas de famílias distintas, como nos vários tecidos constituintes de uma mesma planta, sendo constituídas por duas ou quatro subunidades de 25-30 kDa (Karnchanatat, 2012).

As lectinas nas plantas são sintetizadas em polirribossomas do retículo endoplasmático, localizando-se com maior abundância nas sementes, apesar de também estarem presentes noutros tecidos vegetativos (Peumans e Van Damme, 1995; Vasconcelos e Oliveira, 2004; Müntz, 2007; Vandenborre *et al.*, 2011; Karnchanatat, 2012).

7.2. Mecanismo de acção

As interacções entre os hidratos de carbono e as lectinas das plantas são responsáveis por uma variedade de fenómenos biológicos e desempenham um papel fundamental na defesa das plantas.

As lectinas contendo um único domínio de ligação a um hidrato de carbono formam um complexo monovalente de baixa afinidade. Contudo, para desempenharem funções de inibição de processos biológicos é necessária uma elevada afinidade e especificidade, assim para obter este resultado as lectinas apresentam diversos domínios de ligação ao hidrato de carbono (Deniaud *et al.*, 2011).

As lectinas devido às suas diferenças estruturais e de especificidade apresentam uma grande diversificação funcional. A **Figura 7** representa o mecanismo de acção para algumas funções desempenhadas pelas lectinas, em que os números incluídos ilustram os diferentes mecanismos de acção. As lectinas sintetizadas que se encontram no citoplasma (1) podem ser armazenadas nos vacúolos de reserva proteica, podem ser translocadas para o núcleo da célula onde se associam a ribonucleoproteínas (2) ou

ainda secretadas para o meio extracelular (3), onde funcionam como: receptores de reconhecimento de hidratos de carbono de agentes patogénicos promovendo a opsonização (4), estabelecem ligações entre si, formando complexos que se ligam a hidratos de carbono presentes na superfície da célula que as sintetizou (5) e a hidratos de carbono da matriz extracelular (6). Para além destas acções, as lectinas ligadas entre si também têm possibilidade de formar estruturas na superfície da célula e induzir a agregação de microdomínios que podem desencadear cascatas de sinalização (e.g. apoptose; migração celular; libertação de mediadores) (7) ou ligarem-se a células vizinhas promovendo interacções célula-célula e célula-matriz (8) (Vasta *et al.*, 2012).

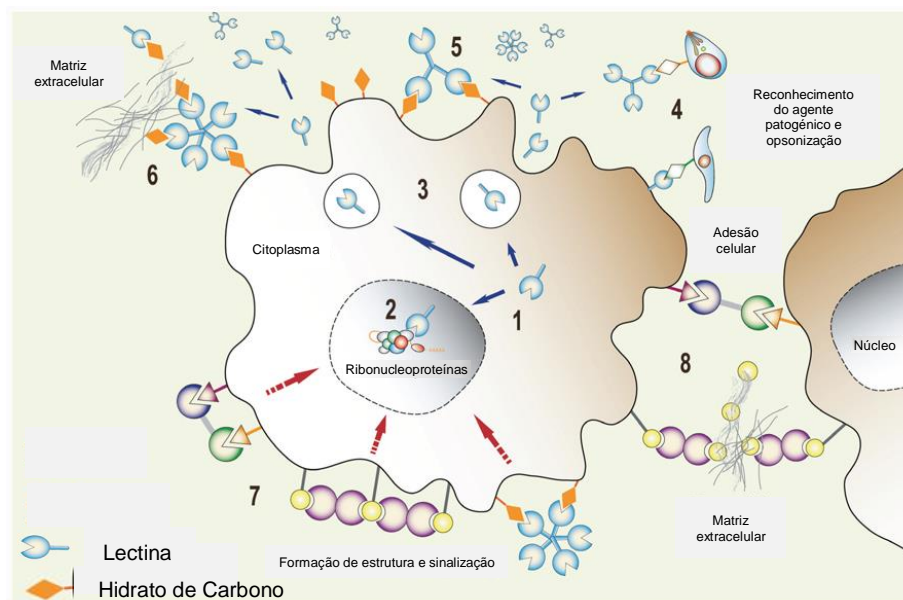


Figura 7. Representação do mecanismo de acção e da diversidade funcional das lectinas. (Adaptada de: Vasta *et al.*, 2012)

7.3. Classificação

Dada a existência de uma grande variedade de lectinas, estas podem ser classificadas de acordo com a sua estrutura, especificidade de ligação ao hidrato de carbono e domínio de reconhecimento do hidrato de carbono (CRD – *Carbohydrate Recognition Domain*) (Vandenborre *et al.*, 2011).

Devido à ligação que as lectinas apresentam com os hidratos de carbono, estas classificam-se quanto à sua **estrutura** em quatro grupos: merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas (**Figura 8**) (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Lam e Ng, 2011). As merolectinas são proteínas que contêm apenas um domínio de ligação ao hidrato de carbono (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Vandenborre *et al.*, 2011; Karnchanatat, 2012). As hololectinas têm pelo menos dois domínios de ligação a

hidratos de carbono idênticos, esta é uma das estruturas encontrada nas lectinas das plantas (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Vandenborre *et al.*, 2011; Karnchanatat, 2012). As quimerolectinas são constituídas por um ou mais domínios de ligação a hidratos de carbono incorporando outros domínios que exercem actividade biológica, sendo esta uma estrutura bastante abundante nas lectinas de plantas (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Vandenborre *et al.*, 2011; Karnchanatat, 2012). Por fim, as superlectinas possuem pelo menos dois domínios de ligação a hidratos de carbono estruturalmente diferentes (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Vandenborre *et al.*, 2011).

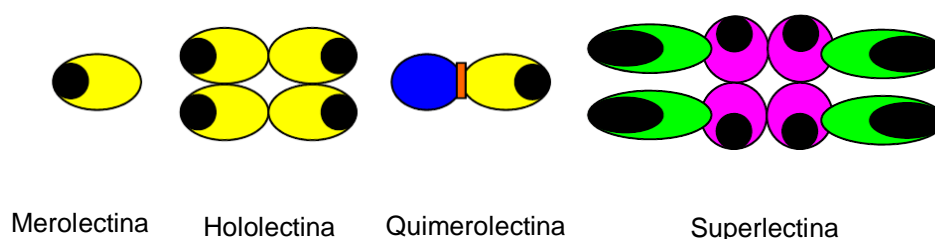


Figura 8. Classificação das lectinas relativamente à sua estrutura. As áreas pretas representam os locais de ligação aos hidratos de carbono. (Adaptada de: Karnchanatat, 2012)

As lectinas são também classificadas de acordo com a **especificidade de ligação ao hidrato de carbono** em seis grupos: lectinas glucose/manose, lectinas galactose/*N*-acetilgalactosamina, lectinas *N*-acetilglucosamina, lectinas L-fucose, lectinas ácido siálico e lectinas de glicanos específicos (Peumans e Van Damme, 1998; Karnchanatat, 2012).

A **classificação CRD** é atribuída em função dos domínios que reconhecem e estabelecem a ligação ao hidrato de carbono. De acordo com esta classificação podem distinguir-se seis grupos de lectinas de plantas: lectinas de monocotiledóneas que se ligam a hidratos de carbono α -D-manose, lectinas com domínio heveína, lectinas com domínios do tipo β -prisma, lectinas de domínios folhas- β , domínio homólogo à cianovirina-N e lectinas de leguminosas. O grupo das lectinas de leguminosas é o que melhor está caracterizado até ao momento, sendo este o mais extensivamente estudado (Varrot *et al.*, 2011; John *et al.*, 2013).

7.4. Funções e aplicações

Na natureza, as lectinas das plantas desempenham diversas funções fisiológicas, uma delas é a protecção das plantas contra agentes patogénicos externos devido à sua capacidade de aglutinarem e imobilizarem esses agentes. Assim, para desempenharem esta função as lectinas estão presentes nos locais com maior potencial

de invasão e têm a capacidade de se ligarem a vários fungos inibindo o seu crescimento nas plantas (Vandenborre *et al.*, 2011; Karnchanatat, 2012; Buul e Brouns, 2014).

Actualmente, as lectinas são objecto de grande interesse devido às suas diversas aplicações na agricultura e na investigação biomédica e biotecnológica, estando a ser exploradas em diversas áreas como as apresentadas na **Tabela 1** (Bah *et al.*, 2013).

Tabela 1. Aplicações das lectinas em diferentes áreas.

Aplicações na agricultura	
Actividade	Exemplos da acção das lectinas
Insecticida	Aumento da actividade enzimática com consequente ruptura das microvilosidades e anormalidades nas células epiteliais dos insectos. ⁽¹⁾
Antibacteriana	Interacção com componentes da parede celular bacteriana. ⁽¹⁾
Antifúngica	Ligação às hifas, resultando numa diminuição na absorção de nutrientes e interferindo com o processo de germinação de esporos. ⁽²⁾
Aplicações imunomodelatórias	
Actividade	Exemplos da acção das lectinas
Antiviral	Interferência na fase inicial do ciclo de replicação do vírus suprimindo o crescimento. Indução da fragmentação do DNA internucleossomal e alteração do potencial transmembranar mitocondrial das células provocando a apoptose celular. ⁽¹⁾⁽²⁾
Antitumoral	Acção dinâmica para reconhecimento de células tumorais (marcadores de superfície), através de adesão celular, localização, transdução de sinal através das membranas, estimulação mitogénica, aumento da defesa imune do hospedeiro, citotoxicidade e apoptose. ⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾
Aplicações biotecnológicas	
Purificação e caracterização de polissacáridos e glicoconjugados	Através de estruturas de proteínas e hidratos de carbono em células (proteoglicanos, glicoproteínas ou glicolípido) e de desenvolvimento de matrizes comerciais de elevada afinidade. ⁽³⁾

(Adaptado de: (1) Hamid, 2013; (2) Bah *et al.*, 2013; (3) Silva *et al.*, 2010)

A utilização de lectinas tem permitido avanços tecnológicos e terapêuticos em muitas áreas, através das suas acções na regulação de várias vias celulares glicoconjugadas, das suas funções fisiológicas de comunicação célula-célula e patológicas de interacção hospedeiro-patogénico.

Contudo no Homem, algumas destas proteínas têm efeitos tóxicos, uma vez que, não são degradadas durante o processo digestivo. Por este motivo, quando estas proteínas estão presentes no intestino podem reconhecer e ligarem-se a hidratos de carbono das células das microvilosidades intestinais e, assim, interferirem com a absorção de nutrientes provocando carências nutricionais, inibirem diversas enzimas intestinais, provocarem efeitos degenerativos nas membranas celulares, alterações das funções imunológicas e hemaglutinação por se ligarem aos eritrócitos (Vasconcelos e Oliveira, 2004; Silva *et al.*, 2010; Gemedé e Ratta, 2014). Os sintomas agudos mais comuns, após a ingestão, incluem náuseas, vómitos e distúrbios intestinais (Gemedé e Ratta, 2014).

Desenvolvimento Experimental

8. Materiais

8.1. Selecção, colheita e preparação de amostras

Seleccionaram-se quatro espécies silvestres: *Rumex crispus* L. (labaça-crespa), *Sinapis arvensis* L. (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* L. (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* L. (serralha-macia), tendo em atenção o local de colheita e o estágio de desenvolvimento das mesmas. Exemplares de cada espécie encontram-se depositados no Herbário do Instituto Superior de Agronomia.

A recolha das amostras e a selecção das folhas mais adequadas para analisar foi realizada tendo em conta o padrão de desenvolvimento anual das mesmas. A colheita dos exemplares foi executada no início da Primavera de 2014 em terrenos incultos da Tapada da Ajuda.

As amostras para as análises da actividade antioxidante foram lavadas, liofilizadas usando o equipamento Scanvac Cool Safe (Frilabo) e mantidas no escuro a -18 °C até posterior utilização.

A fim de determinar o teor de humidade e cinza, as folhas frescas foram de imediato utilizadas, sem terem sido lavadas nem sujeitas a nenhum tratamento.

As folhas para o estudo das lectinas foram imersas em azoto líquido e conservadas a -80 °C até serem analisadas.

8.2. Reagentes

Na análise das propriedades antioxidantes os reagentes acetato de sódio e ácido acético foram fornecidos, respectivamente, pela Riedel-de Haën e Fisher Scientific UK Limited. O 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), o 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) e o sulfato ferroso hexa-hidratado foram obtidos na Sigma-Aldrich. Os padrões ácido gálico e Trolox 97% (m/m) foram adquiridos, respectivamente, na Sigma e Acrös Organics. Os reagentes Folin, cloreto de ferro hexa-hidratado PRS e o ácido nítrico a 69% (v/v) foram fornecidos pela Panreac.

Na preparação dos extractos para análise proteómica o azoto líquido utilizado era fornecido pela Air Liquide. A polivinilpolipirrolidona era da Fluka, o Trizma Base Ultrol Grade da Calbiochem, o dietilcarbamato de sódio tri-hidratado da Merck tal como a L-cisteína, e os comprimidos *cocktail* inibidores de proteases sem ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) (*Complete Mini EDTA-Free*) da Roche.

Nas electroforeses, o persulfato de amoníaco (PSA) e o *N,N,N',N'*-Tetrametiletilenodiamina (TEMED) utilizados eram da Sigma.

Para a análise bidimensional, o ditioneitol (DTT) e a iodoacetamida foram adquiridos na Sigma.

Para as colorações, o tiosulfato de sódio penta-hidratado, o nitrato de prata, o carbonato de cálcio e o ácido tricloroacético (TCA) foram obtidos na Merck.

Para a glicodetecção, a concanavalina A de *Canavalia ensiformis* (Con-A), a peroxidase, a avidina-peroxidase, o reagente Tween-20, o peróxido de hidrogénio e para a coloração o 4-cloro-1-naftol foram fornecidos pela Sigma.

Todos os outros reagentes utilizados eram de grau analítico e foram adquiridos em fontes comuns. A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Ultra-Pure Water System Millipore).

9. Métodos

9.1. Determinação do teor de humidade, cinza e minerais

Com o intuito de determinar o teor de humidade, numa balança analítica (Kern 870) pesou-se 5 g de amostra de folha fresca triturada para cadinhos metálicos previamente tarados. O material vegetal de *Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus* foi seco em estufa (WTC Binder) a $+105 \pm 2$ °C até se obter uma massa constante.

A fim de determinar o teor de cinza, em cápsulas de porcelana previamente taradas pesou-se cerca de 5 g de folha fresca triturada. As amostras foram colocadas na mufla (Heraeus MR 170) a $+550 \pm 50$ °C para remoção da matéria orgânica, sendo retiradas e arrefecidas num exsiccador após estarem completamente incineradas. Posteriormente, determinou-se a massa de cinza.

No método para a avaliação da componente mineral baseado em Vandecasteele e Block (1993), a cinza obtida foi solubilizada em 10 mL de uma solução aquosa de ácido nítrico (1:1) e colocada em banho de água a $+95$ °C durante 30 min. Posteriormente, a cinza hidrolisada foi filtrada para balões volumétricos de 100 mL perfazendo o volume com água Milli-Q. A determinação quantitativa foi realizada por espectrofotometria de absorção atómica para o sódio, potássio, cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês. A análise do fósforo foi realizada por espectrofotometria de absorção molecular pelo método do vanadato-molibdato de amónio.

Em todas as determinações, as amostras foram analisadas em triplicado.

9.2. Análise das propriedades antioxidantes

9.2.1. Determinação do teor de compostos fenólicos

Na extracção para a determinação do teor total de compostos fenólicos, a 0,2 g de amostra de folha liofilizada reduzida a pó foram adicionados 10 mL de metanol, homogeneizou-se a mistura e manteve-se em repouso a +4 °C durante 12 h, ao abrigo da luz. Posteriormente, centrifugou-se (Hermle Z 383 K Centrifuge) a solução a 23000 x g durante 15 min a +4 °C. Retirou-se o sobrenadante e manteve-se sob refrigeração até à sua utilização.

O método seguido para a determinação foi baseado em Swain e Hillis (1959) utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. Assim, em frascos escuros foram colocados 2,4 mL de água destilada, 150 µL de amostra (sobrenadante obtido anteriormente) e 150 µL de reagente Folin-Ciocalteu (0,25 M). À mistura, depois de homogeneizada em vórtex e de reagir durante 3 min, adicionaram-se 300 µL de carbonato de sódio. Após uma nova agitação, deixou-se a solução em repouso no escuro à temperatura ambiente durante 2 h. Passado esse tempo, procedeu-se às leituras de absorvância a 725 nm utilizando o espectrofotómetro Unicam UV/Vis Spectrometer UV4. Os resultados foram obtidos através do *software* Vision V3.31.

A curva de calibração foi preparada com base numa solução inicial de ácido gálico (1000 mg/ L) a partir da qual foram obtidos pontos de concentração de 50 a 1000 mg/ L.

Realizaram-se sempre triplicados, tendo as amostras de *Rumex crispus* e *Beta maritima* sido diluídas de 1:10 e 1:5, respectivamente. Os resultados finais foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g matéria seca.

9.2.2. Procedimento de extracção para determinação da actividade antioxidante

Para as análises de determinação da actividade antioxidante, inicialmente, foram realizadas as extracções dos compostos das folhas de cada espécie (*Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*).

Para cada espécie, a amostra de folhas liofilizadas (0,2 g) foi reduzida a pó e a extracção foi feita com metanol (10 mL) a +60 °C durante 1 h sob agitação magnética a 150 rpm. Posteriormente, a amostra foi centrifugada (Hermle Z 383 K Centrifuge) durante 15 min a 15000 x g, retirando-se o sobrenadante e utilizando-o para as análises.

9.2.3. Determinação da captação de radicais DPPH

Neste método, baseado em Brand-Williams *et al.* (1995) com algumas modificações, foram preparadas duas soluções: uma solução-mãe e uma solução diária de 2,2-Difenil-picril-hidrazilo (DPPH).

A solução-mãe foi preparada dissolvendo 24 mg de DPPH em 100 mL de metanol e, posteriormente, armazenada a -18 °C durante, no mínimo, 2 h.

A solução diária é obtida por homogeneização de 10 mL da solução-mãe de DPPH com 50 mL de metanol, ajustando este reagente de modo a obter uma absorvância de $1,1 \pm 0,02$ a 517 nm utilizando o espectrofotômetro Unicam UV/Vis Spectrometer UV4.

Relativamente às amostras, colocaram-se em frascos escuros 4 mL da solução diária de DPPH e 150 µL do extracto das folhas preparado (como descrito em 9.2.2.), após 40 min de reacção no escuro e à temperatura ambiente, procedeu-se à leitura de absorvância a 517 nm. A amostra de referência (branco) foi preparada juntamente com as anteriores e continha 4 mL da solução diária de DPPH e 150 µL de metanol.

Na construção da curva padrão, a partir de uma solução-mãe de Trolox a 800 µM, efectuaram-se diluições sucessivas de modo a ter concentrações de 25 a 800 µM.

A partir dos valores de absorvância obtidos determinou-se os valores de %*Radical Scavenging Activity* (RSA) através da seguinte fórmula:

$$RSA (\%) = \frac{Abs. Sol. Diária - Abs. Amostra}{Abs. Sol. Diária} \times 100$$

No cálculo do *Trolox Equivalent Antioxidant Capacity* (TEAC) utilizou-se a curva de calibração $y = m \cdot x + b$, correspondendo *y* ao valor de RSA e *x* ao valor de Trolox. Assim, a actividade antioxidante de todas as amostras realizadas em triplicado foi expressa em mol de equivalentes de Trolox por g de massa seca.

9.2.4. Determinação do poder redutor

No método de determinação do poder redutor, baseado em Rufino *et al.* (2006), inicialmente preparam-se as seguintes soluções: solução de HCl 40 mM, solução tampão acetato 0,3 M a pH 3,6, solução de 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ) 10 mM, solução de cloreto de ferro 20 mM e, por fim, a solução do reagente *Ferric Reducing Antioxidant Power* (FRAP). Este reagente é obtido por homogeneização de 25 mL de tampão acetato 0,3 M a pH 3,6, 2,5 mL de solução TPTZ 10 mM e 2,5 mL de solução

de cloreto de ferro 20 mM. No entanto, a quantidade necessária de reagente pode variar dependendo do número de amostras.

Em frascos de vidro escuro, colocaram-se 90 µL de extracto das folhas (obtido como descrito em 9.2.2.), 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente FRAP. Após 30 min em banho de água a +37 °C, efectuaram-se as leituras de absorvância a 595 nm e utilizou-se o reagente FRAP como referência (branco) para calibrar o espectrofotómetro Unicam UV/Vis Spectrometer UV4.

A curva padrão resultou da preparação de uma solução de sulfato ferroso 2 mM, a partir da qual se procedeu a diluições sucessivas variando a concentração de 500 a 1500 µM.

Todas as amostras analisadas em triplicado foram diluídas de 1:10, excepto as de *Rumex crispus* que foram diluídas na proporção 1:50. Os resultados apresentam-se expressos em mmol de Fe (II) por g de massa seca de folha.

9.3. Análise de lectinas

9.3.1. Procedimento de extracção proteica

As folhas ensaiadas, correspondentes às quatro espécies em análise (*Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*), foram sujeitas a diferentes condições: estado cru e sujeitas à ebulição (+100 °C) durante 15 min e 30 min.

No processo de obtenção de extractos totais de proteína (Jacobs *et al.*, 1999), pulverizaram-se num almofariz, com o auxílio de azoto líquido, cerca de 11 g de **folha crua** até obter uma amostra pulverizada que se homogeneizou com 5,5 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP) (0,5 g PVPP: 1 g de folha). As proteínas foram extraídas com a adição de tampão Tris-HCl 350 mM a pH 8,0, contendo 11 mM dietilcarbamato de sódio tri-hidratado e 15 mM L-cisteína, na proporção de 10 mL por g de amostra, homogeneizando-se com um comprimido cocktail inibidor de proteases a cada 10 mL de tampão. Posteriormente, filtrou-se a solução através de gaze e o filtrado resultante foi centrifugado (Beckman J2-21M/E Centrifuge) a 18000 x g durante 15 min a +4 °C. O sobrenadante obtido, contendo as proteínas extraídas, foi dessalinizado em coluna PD-10 (GE Healthcare), para tampão Tris-HCl 50 mM a pH 7,5.

Na obtenção das amostras que sofreram **tratamento térmico**, as folhas (100 g) conservadas a -18 °C foram imersas em 200 mL de água da rede, sendo sujeitas a +100 °C, a dois tempos diferentes, durante 15 min e durante 30 min. Após esses tempos, as folhas foram trituradas no seio da solução de cozedura, até se obter um homogenato.

Esse homogenato depois de arrefecer, foi filtrado através de gaze e centrifugado (Beckman J2-21M/E Centrifuge) a $18000 \times g$ durante 15 min a $+4^\circ\text{C}$, retirando-se o sobrenadante. Apenas para as amostras de *Rumex crispus*, o sobrenadante obtido foi dessalinizado em coluna NAP-10 (GE Healthcare) para NaCl 0,3 M.

Todos os extractos obtidos foram conservados a -80°C até à sua utilização.

9.3.2. Determinação do teor proteico

O teor proteico de cada amostra foi obtido pelo método de Bradford (Bradford, 1976) que é um ensaio simples, rápido, reprodutível e sensível.

Com o intuito de quantificar o teor proteico de uma amostra, realizou-se uma curva de calibração utilizando como padrão *Bovine Serum Albumin* (BSA) numa gama de concentrações de 0 a $25 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína, todas elas em triplicado.

A fim de determinar a proteína total das amostras de folhas foram testados diferentes volumes, de modo a que alguma leitura de absorvância obtida se registasse na zona de linearidade da gama limitada da curva de calibração, obedecendo à lei de Lambert-Beer.

Assim, a partir das diluições seriadas do padrão de BSA e da utilização de diferentes volumes de amostra das folhas estudadas, igualmente em triplicado, adicionaram-se $200 \mu\text{L}$ de reagente Bradford (Sigma) e após incubação, ao abrigo da luz durante 10 min, procederam-se às leituras de absorvância a 595 nm num espectrofotómetro (Synergy HT), sendo os resultados obtidos pelo *software* KC4. Deste modo, através da equação da curva de calibração que nos fornece a informação da relação entre as concentrações conhecidas do padrão utilizado e o valor de absorvância correspondente, foi possível determinar a concentração proteica das amostras estudadas através do seu valor de absorvância obtido.

9.3.3. Electroforeses SDS-PAGE

As electroforeses realizaram-se em gel de poliacrilamida desnaturante e não redutor (SDS-PAGE-NR) e em gel de poliacrilamida desnaturante e redutor (SDS-PAGE-R). Os géis de $18 \times 16 \times 0,075 \text{ cm}$ com uma matriz de acrilamida de 17,5% (m/v), foram corridos em sistema de tampões descontínuo (Laemmli, 1970).

Para o gel de concentração, utilizou-se acrilamida a 5% (m/v), bisacrilamida a 0,13% (m/v), Tris-HCl 125 mM a pH 6,8, PSA a 0,1% (m/v) e TEMED a 0,05% (v/v). O gel de separação foi constituído por acrilamida a 17,5% (m/v), bisacrilamida a 0,1% (m/v), Tris-HCl 375 mM a pH 8,8, PSA 0,03% (m/v) e TEMED 0,03% (v/v).

Na preparação das amostras, armazenadas a -80 °C, utilizou-se tampão de amostra não redutor concentrado quatro vezes, constituído por Tris-HCl 80 mM a pH 6,8, 2% (m/v) de SDS, 15% (v/v) de glicerol e 0,01% (v/v) de m-Cresol púrpura. Sendo que o tampão de amostra redutor para além desses constituintes também continha 100 mM de β -mercaptoetanol. As amostras, consoante os seus volumes, foram preparadas com esses tampões na razão 1:1 ou 1:3 (volume de tampão amostra : volume de amostra). Posteriormente, essa mistura foi sujeita a desnaturação, por ebulição durante 4 min, em tubos eppendorf e conservada a -80 °C até à sua utilização.

Paralelamente à aplicação das amostras, aplicou-se 3 μ L de marcador de massa molecular (10 - 250 kDa) (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad). Estabeleceram-se as condições eléctricas de 220 V e 70 mA por gel e cerca de 3 h depois a corrida estava terminada. Para a detecção dos polipéptidos dos géis, após fixação das proteínas, recorreu-se à coloração com nitrato de prata ou, de acordo com o objectivo, à coloração pelo Coomassie Brilliant Blue R 250.

9.3.4. Análise bidimensional de proteínas

Numa análise bidimensional as proteínas são submetidas a dois processos consecutivos (duas dimensões) de separação, baseados em propriedades diferentes das proteínas. Neste trabalho, a primeira dimensão consistiu em separar as proteínas consoante o seu ponto isoeléctrico, num gradiente de pH de 3-10, através da focagem isoeléctrica. Na segunda dimensão, as proteínas separadas pela focagem isoeléctrica são submetidas a uma eletroforese SDS-PAGE-R de modo a separar os polipéptidos de acordo com suas massas moleculares. Esta técnica permite-nos obter uma informação detalhada da composição peptídica de uma amostra.

- **Primeira dimensão (1D): Focagem isoeléctrica**

Na focagem isoeléctrica, o teor proteico utilizado das amostras de folhas de *Rumex crispus* foi de 500 μ g, para a *Sinapis arvensis* e *Beta maritima* foram aplicados 350 μ g e para o *Sonchus oleraceus* foram aplicados 700 μ g. Estas amostras foram previamente lavadas em água bidestilada, por centrifugação (Beckman Coulter Allegra 25R Centrifuge), três vezes a 2300 x g durante 15 min a +4 °C em tubos Microsep Advance Centrifugal Device 10K (Pall Corporation), de modo a eliminar compostos que interferissem na migração dos polipéptidos do gel, tais como sais, detergentes, compostos fenólicos, ácidos nucleicos e polissacáridos, sendo de seguida armazenadas a -80 °C. Posteriormente, depois da lavagem, as amostras foram precipitadas em

acetona e, após centrifugação (15300 x g durante 10 min), o sedimento foi solubilizado em tampão de reidratação (em volume ajustado ao comprimento da tira de focagem, geralmente 200 µL, para 11 cm), constituído por 7 M ureia, 2 M tiourea, 2% (v/v) NP40 e 1% (m/v) DTT, ao qual se adicionou 4 µL de IPG Buffer pH 3-10 (GE Healthcare Bio-Sciences AB) e, por fim, foram centrifugadas (Himac CT15 Centrifuge) a 15300 x g durante 10 min a +20 °C. As amostras assim tratadas foram colocadas nas calhas do aparelho de focagem isoelectrica (Protean IEF Cell, Bio-Rad). As tiras de gel ReadyStrip IPG Strips, 11 cm, pH 3-10 (Bio-Rad) foram colocadas a encimar as amostras e, por último, adicionou-se óleo mineral de modo a isolar a amostra.

O programa de focagem realizou os seguintes passos: reidratação – 30 V. h, 12 h; etapa 1 – 250 V. h, 1 h; etapa 2 – 500 V. h, 2 h; etapa 3 – 1000 V. h, 2 h; etapa 4 – 2500 V. h, 3h30; etapa 5 (gradiente) – 8000 V durante 25 min. Ao fim de 21 h, retiraram-se as tiras de gel e colocaram-se em tubos de vidro, tendo-se conservado a -80 °C, até serem ensaiadas (Ribeiro, 2008).

- **Segunda dimensão (2D): SDS-PAGE-R**

Na segunda dimensão, incubaram-se as tiras de gel numa solução constituída por Tris-HCl 50 mM a pH 8,8, 6 M ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 1% (m/v) DTT durante 15 min com agitação. Após esse tempo, removeu-se a solução e voltou a incubar-se com outra solução composta por Tris-HCl 50 mM a pH 8,8, 6 M ureia, 30% (v/v) glicerol, 2% (m/v) SDS e 2,5% (m/v) iodoacetamida durante mais 15 min com agitação de modo a remover o DTT.

Terminada a incubação aplicou-se a amostra focada (IEF) na parte superior do gel da bidimensional, colocaram-se num poço previamente formado 3 µL de marcador de massa molecular (Precision Plus Protein All Blue Standards, Bio-Rad ou NZY Colour Protein Marker II, Nzytech) e preencheu-se esse espaço com uma solução de agarose de baixa electroendosse (EEO) a 0,5% (m/v). O gel de separação (2D) SDS-PAGE de acrilamida a 17,5% (m/v) foi preparado como já descrito anteriormente (9.3.3). Nos primeiros 15 min, estabeleceu-se uma voltagem e amperagem, respectivamente, de 220 V e 15 mA, sendo que depois da entrada da amostra no gel de separação, as condições eléctricas foram alteradas para 220 V e 30 mA (Ribeiro, 2008). Ao fim de aproximadamente 7 h a corrida estava finalizada. O gel obtido, após fixação, foi posteriormente revelado pela coloração com nitrato de prata.

9.3.5. Detecção de polipéptidos no gel

Depois da separação electroforética dos polipéptidos por SDS-PAGE, em condições redutoras ou não redutoras, os géis foram sujeitos a diversos tratamentos com o objectivo de revelarem as bandas correspondentes aos polipéptidos. De modo a obter um gel que permita a revelação dos polipéptidos, é necessário que o agente de coloração se ligue, portanto, que apresente especificidade para os polipéptidos e que exista uma proporcionalidade linear entre a densidade da banda revelada e a concentração de proteína (Merril *et al*, 1979).

9.3.5.1. Coloração com nitrato de prata

Esta técnica de coloração é cerca de 100 vezes mais sensível que a coloração pelo Coomassie Brilliant Blue R 250 e é muito mais económica e rápida do que outros métodos de detecção altamente sensíveis (Merril *et al.*, 1979).

Neste método baseado em Blum *et al.* (1987) para a fixação das proteínas o gel foi colocado, no mínimo durante 20 min numa solução constituída por: 50% (v/v) metanol, 12% (v/v) ácido acético e 0,05% (v/v) de formaldeído. Posteriormente, realizaram-se três lavagens de 10 min cada, com uma solução de etanol a 50% (v/v), seguindo-se um pré-tratamento com uma solução de tiosulfato de sódio a 0,02% (m/v) durante 1 min e novamente três lavagens com água bidestilada, de 20 s cada. Após esses tratamentos, o gel foi imerso na solução de nitrato de prata (2 g/L AgNO₃ com 0,75 mL/ L formaldeído) por um período de 10 min com agitação. Decorrido esse tempo, fizeram-se duas lavagens de 20 s cada com água bidestilada e, de seguida, adicionou-se a solução de revelação constituída por 60 g/ L de carbonato de sódio, 0,5 mL/ L de formaldeído e 4 mg/ L de tiosulfato de sódio. O gel ficou imerso nessa solução, sob agitação suave, até se revelarem as bandas polipeptídicas com a intensidade desejada, terminando a reacção com a solução de paragem (50% (v/v) metanol e 12% (v/v) ácido acético).

9.3.5.2. Coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250

Na detecção de polipéptidos, este é o método de coloração mais vulgar devido à sua simplicidade e pelo facto de não exigir uma grande quantidade de proteína (ordem dos microgramas) para apresentar bandas bem definidas.

Para a fixação das proteínas, o gel foi colocado com uma ligeira agitação numa solução de TCA 10% (m/v) durante 30 min. Passado esse tempo, o gel foi imerso numa solução de coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250 0,3% (m/v), a 10% (v/v) ácido

acético e a 25% (v/v) 2-Propanol durante 3 h. Para remover o excesso de corante e proceder à descoloração, o gel foi lavado por várias vezes com uma solução descorante a 10% (m/v) ácido acético e a 25% (m/v) 2-propanol.

9.3.5.3. Secagem dos géis

A fim de conservar os géis e, posteriormente, os poder analisar e comparar com outros, após a coloração, procedeu-se à secagem de todos os géis realizados. Para tal, o gel foi imerso em metanol a 50% (v/v) durante cerca de 3 h para desidratar. Decorrido este tempo, colocou-se o gel entre duas folhas de papel celofane humedecidas em metanol a 50% (v/v). Depois desta montagem em formato de sanduíche, colocou-se a secar à temperatura ambiente durante cerca de 24 h.

9.3.6. Imobilização de polipéptidos em membrana de nitrocelulose para glicodetecção

Para a detecção de glicopolipéptidos foram preparadas amostras de folhas cruas e amostras de folhas sujeitas a +100 °C, durante 30 min, das quatro espécies (*Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*), com um teor proteico de 300 µg, que se aplicou a uma electroforese em gel SDS-PAGE redutor de acrilamida a 17,5% (m/v), para cada uma das condições a ensaiar. Terminada a corrida, o gel com as amostras em duplicado foi cortado simetricamente, obtendo-se um gel controlo e um gel utilizado para a glicodetecção.

O gel controlo, usado para detecção dos polipéptidos, após fixação das proteínas, foi sujeito à coloração com Coomassie Brilliant Blue R 250, seguindo-se a descoloração e apreciação do gel.

O gel destinado à glicodetecção, junto com a membrana de nitrocelulose, foi incubado em tampão de transferência (25 mM Tris-Base, 190 mM glicina, metanol 20% (v/v) e 0,1% (m/v) SDS), durante 15 min. Em simultâneo colocou-se, no mesmo tampão, as oito folhas de papel 3MM, dimensionadas ao tamanho do gel, durante 10 min. Após a incubação, procedeu-se à montagem no formato de sanduíche, de modo a electro transferir os polipéptidos do gel para a membrana. Assim, no eléctrodo do aparelho de transferência (Trans-Blot SD, Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), segundo o seguinte esquema, aplicaram-se: quatro folhas de papel 3 MM, depois a membrana de nitrocelulose à qual se sobrepôs o gel e, por último, as restantes quatro folhas de papel 3 MM. Em todos estes passos teve-se sempre o cuidado de retirar as bolhas de ar. Para dar início à transferência, colocou-se o eléctrodo superior, fechou-se o aparelho e

definiram-se as condições eléctricas para 15 V sem amperagem definida. Ao fim de 55 min a transferência estava finalizada.

Seguiu-se o controlo da transferência por coloração com Ponceau S. Assim, para imobilizar as proteínas, a membrana foi imersa, durante 5 min, numa solução de fixação constituída por 10% (v/v) de ácido acético e 25% (v/v) de isopropanol, de seguida, lavou-se com água bidestilada durante 1 min e colocou-se o corante Ponceau S apenas para confirmar se a transferência tinha sido bem sucedida. Por último, realizaram-se mais três lavagens com água bidestilada. A membrana foi seca e guardada entre folhas de papel 3 MM até se realizarem os procedimentos seguintes com vista à glicodetecção.

Na detecção de glicoproteínas, segundo Faye e Chrispeels (1985), a membrana foi lavada, durante 1 min, em TBS (tampão Tris-HCl 0,02 M a pH 7,4 e 0,5 M NaCl). Posteriormente, durante 1 h, bloqueou-se a membrana com TTBS (TBS e 0,1% (m/v) de Tween-20) e, decorrido esse tempo incubou-se com 25 µg/ mL de concanavalina A em TTBS e SAIS (TTBS, 1 mM CaCl_2 e 1 mM MgCl_2). De seguida, procedeu-se a quatro lavagens com tampão TTBS e SAIS durante 10 min cada, e incubou-se a membrana, durante mais 1 h, com 50 µg/ mL de peroxidase em TTBS e SAIS. Realizaram-se mais quatro lavagens com tampão TTBS e SAIS, durante 10 min cada, seguidas de 5 min de incubação com TBSS (5 mL TBS com 5 µL CaCl_2 1 M e 5 µL MgCl_2 1 M). Por fim, adicionou-se a solução corante composta por 0,05% (m/v) de 4-cloro-1-naftol, dissolvido em 16,6% (v/v) de metanol, 83,3% (v/v) (TBS e SAIS) e 0,1% H_2O_2 a 30% (v/v). Aguardaram-se, alguns minutos, para a revelação dos resultados.

No entanto, estes não foram observados pelo que se fez o aproveitamento da membrana, recorrendo à técnica de *stripping* que consiste numa lavagem com uma solução de glicina-HCl 0,1 M (pH 2,5 -3,0) durante 30 min, com uma ligeira agitação. Decorrido esse tempo, fez-se mais uma lavagem com hidróxido de sódio 0,1 M por mais 30 min com agitação. Após a eliminação das ligações anteriores às proteínas, repetiram-se os procedimentos anteriores até às primeiras quatro lavagens com TTBS e SAIS. Em seguida, a membrana foi imersa numa solução de 25 µL de avidina-peroxidase e 50 mL de TTBS e SAIS durante 1 h. Lavou-se, novamente, em 10 min com TTBS e SAIS por quatro vezes e depois com TBSS durante 5 min. As soluções corantes do kit Super Signal West Pico (Thermo Scientific) misturaram-se, no momento, numa proporção 1:1 e adicionaram-se à membrana incubando-a durante 3 min, ao fim dos quais se observaram os resultados no aparelho ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad) através do *software* Image Lab, permitindo a visualização dos polipéptidos glicosilados.

9.3.7. Determinação da actividade hemaglutinante

9.3.7.1. Preparação da solução de eritrócitos de coelho a 4% (v/v)

Recolheram-se para tubos de hemograma com anticoagulante (citrato de sódio), 6,9 mL de sangue por punção da veia marginal dorsal na parte distal da orelha direita de coelho da raça neozelandesa (mantido em cativeiro no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa).

De modo a separar os glóbulos do plasma, efectuou-se uma centrifugação a 935 x g durante 6 min a +13 °C, de seguida, lavaram-se três vezes os glóbulos com soro fisiológico estéril (40 mL soro fisiológico : 5 mL de sangue) e entre cada lavagem realizou-se uma centrifugação a 935 x g durante 6 min a +13 °C, rejeitando-se sempre o sobrenadante.

Os eritrócitos lavados e sedimentados (aproximadamente 5,52 mL) foram ressuspensos em 138 mL de soro fisiológico ao qual se adicionou tripsina (Sigma-Aldrich) na concentração final de 0,1% (m/v), incubando-se 1 h, a +37 °C, com agitação. Fez-se uma nova centrifugação (935 x g, durante 6 min a +13 °C), removendo-se o sobrenadante, e procedeu-se, como anteriormente, a três novas lavagens do sedimento. Por fim, os eritrócitos sedimentados foram ressuspensos em 138 mL de soro fisiológico, ficando-se com uma solução de eritrócitos a 4% (v/v).

Estes eritrócitos assim tratados, foram divididos e conservados a +4 °C para serem utilizados nos ensaios de inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares. A solução de eritrócitos considerou-se dentro da validade enquanto não apresentou hemólise eritrocitária (Ribeiro, 2008).

9.3.7.2. Ensaios de hemaglutinação

Nos ensaios de hemaglutinação, as amostras em estudo (*Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*), foram lavadas por quatro vezes em sistemas de ultrafiltração com soro fisiológico (0,9% (m/v) NaCl contendo 2 mM Ca²⁺ e 2 mM Mg²⁺), de modo a evitar a lise eritrocitária. Para cada extracto ensaiaram-se três teores proteicos: 100, 300 e 500 µg, de modo a conferir abrangência no primeiro ensaio.

Os ensaios realizaram-se em microplaca (da Greiner), de 96 poços, com o fundo em U. Em cada poço depositaram-se 80 µL de soro fisiológico e no primeiro poço, de cada linha horizontal, 80 µL de amostra de folhas cruas e sujeitas a +100 °C por 30 min, contendo 100, 300 e 500 µg de proteína. Nos restantes poços, procederam-se a diluições seriadas das amostras, de 1:2, do primeiro ao último poço. Por último,

depositam-se, em todos os poços, 80 µL da solução de eritrócitos a 4% (v/v), tendo a amostra ficado diluída de 1:3.

Houve sempre, um controlo negativo de soro fisiológico e um controlo positivo de concanavalina A, na concentração de 500 µg/ mL. Por fim, incubou-se a placa, sem agitação, a +37 °C, durante 30 min e a leitura fez-se passados mais 30 min, à temperatura ambiente, por visualização directa.

Um resultado negativo, revela-se pela formação de um núcleo de precipitação de eritrócitos, rodeado de um sobrenadante transparente e incolor. Um resultado positivo, manifesta-se pela aderência dos eritrócitos ao fundo da placa (hemaglutinação) formando-se um revestimento e não se revelando, por vezes, sobrenadante ou por apresentar uma certa retracção do revestimento eritrocitário.

Uma unidade hemaglutinante (U.H.), define-se como a concentração mais baixa de proteína que manifesta actividade hemaglutinante sobre uma solução de eritrócitos. Determina-se pela razão $U.H. = \text{proteína total ensaiada} / 3^{n-1}$ proteína total, sendo n= última diluição efectuada que ainda exhibe actividade hemaglutinante (Ribeiro, 2008).

9.3.7.3. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares

Os testes de especificidade aos açúcares determinaram-se por incubação de 4 U.H. da proteína a ser testada, com uma bateria de 16 açúcares, cada um deles diluído seriadamente de 1:3. Os açúcares testados (todos fornecidos pela Sigma, com excepção dos indicados), na concentração 0,1 M, foram os seguintes: 1- glucose, 2- glucosamina, 3- *N*-acetil-D-glucosamina, 4- galactose, 5- galactosamina (Calbiochem), 6- *N*-acetil-D-galactosamina, 7- lactose, 8- manose, 9- rafinose, 10- L-fucose (Fluka), 11- melezitose, 12- metil-α-glucopiranosido, 13- metil-α-manosido, 14- sacarose, 15- maltose e 16- ácido *N*-acetil-neuramínico.

Os ensaios foram realizados em microplaca, de 96 poços, com o fundo em U, onde se começou por depositar, em cada poço da placa e em número igual às diluições que se pretendeu fazer, um volume de 70 µL de soro fisiológico.

Diluiu-se sucessivamente o açúcar (70 µL), que se aplicou unicamente no primeiro poço, na proporção de 1:2, em soro fisiológico, tantas vezes quantas as diluições que se pretenderam testar.

Seguiu-se a deposição de 70 µL da amostra de proteína (4 U.H.) em todos os poços. Deixou-se incubar 1 h, à temperatura ambiente. Por último, depositou-se 70 µL da solução de eritrócitos a 4% (v/v) em todos os poços, ficando o açúcar diluído de 1:3.

Deixou-se incubar, novamente, 1 h, à temperatura ambiente. Executou-se sempre um controlo positivo com concanavalina A e um negativo com soro fisiológico.

Um resultado positivo origina a formação de um núcleo de precipitação de eritrócitos, rodeado de um sobrenadante transparente e incolor, isto é, houve inibição da hemaglutinação. Este resultado significa que para determinado açúcar, este se ligou à proteína revelando especificidade, ficando esta incapaz de se ligar aos receptores glicosilados dos eritrócitos. Nestes casos, anota-se a concentração mínima de açúcar que ainda provoca 100% de inibição da aglutinação, estabelecendo-se a concentração mínima inibitória (c.m.i.) (Ribeiro, 2008). Um resultado negativo manifesta-se pela aderência dos eritrócitos ao fundo da placa de hemaglutinação formando um revestimento. Este resultado significa que a proteína não se ligou ao açúcar, ou seja, não revelou especificidade mas aglutinou os eritrócitos.

9.5. Análise estatística

Todos os ensaios foram efectuados em triplicado. Os resultados foram expressos apresentando o valor médio e o desvio-padrão, e analisados através do teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$. A análise estatística foi efectuada utilizando os programas *Microsoft Office Excel 2013* e *Statistica v. 12*.

10. Resultados e Discussão

10.1. Micronutrientes

Os resultados da humidade, teor de cinza e composição mineral para as folhas das quatro espécies estudadas apresentam-se na **Tabela 2**.

Tabela 2. Teores de humidade, cinza e minerais nas folhas das quatro espécies estudadas (média \pm desvio-padrão, n=3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Rumex crispus</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	<i>Beta maritima</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>
Humidade ¹	80,23 \pm 0,19 d	83,14 \pm 0,11 c	85,91 \pm 0,07 b	88,36 \pm 0,07 a
Cinza ¹	1,75 \pm 0,06 c	2,45 \pm 0,02 a	2,24 \pm 0,04 b	1,58 \pm 0,01 d
Minerais ²				
Fósforo (P)	61,35 \pm 2,64 c	73,21 \pm 2,57 a	28,30 \pm 1,07 b	54,67 \pm 3,24 c
Sódio (Na)	13,62 \pm 2,86 b	55,30 \pm 2,54 c	375,78 \pm 7,94 a	60,55 \pm 0,27 c
Potássio (K)	427,55 \pm 26,43 a	302,38 \pm 22,76 b	95,82 \pm 7,06 d	211,07 \pm 5,70 c
Cálcio (Ca)	25,32 \pm 1,90 b	129,80 \pm 6,13 a	21,69 \pm 0,75 b	20,18 \pm 2,48 b
Magnésio (Mg)	43,93 \pm 2,16 c	54,55 \pm 5,77 c	91,06 \pm 3,90 a	21,25 \pm 4,90 b
Ferro (Fe)	2,05 \pm 0,11 a	3,99 \pm 0,41 a	2,33 \pm 0,23 a	2,40 \pm 1,10 a
Cobre (Cu)	0,39 \pm 0,07 a	0,40 \pm 0,07 a	0,13 \pm 0,02 a	0,22 \pm 0,13 a
Zinco (Zn)	0,34 \pm 0,02 b	0,58 \pm 0,03 a	0,37 \pm 0,01 b	0,54 \pm 0,01 a
Manganês (Mn)	0,32 \pm 0,02 c	0,59 \pm 0,03 b	0,69 \pm 0,03 a	0,18 \pm 0,03 d

¹ g/ 100 g de massa fresca

² mg/ 100 g de massa fresca

Para a análise comparativa dos teores em micronutrientes foram selecionadas quatro espécies de produtos hortícolas comuns, pertencentes à mesma família das plantas estudadas. Assim, as seguintes espécies comuns, *Rheum rhabarbarum* (ruibarbo), *Brassica napus* (nabiças), *Beta vulgaris* (acelga-comum) e *Lactuca sativa* (alface) são comparadas, respectivamente, com o *Rumex crispus* (labaça-crespa), *Sinapis arvensis* (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* (serralha-macia).

A análise das **Tabelas 2 e 3** permite observar que as plantas silvestres apresentam teores de humidade significativamente diferentes entre si e consideravelmente inferiores aos das plantas cultivadas correspondentes. Esta variação deve-se, possivelmente, ao facto das plantas silvestres estarem sujeitas às condições edafo-climáticas existentes, ao contrário das cultivadas que, geralmente, são sujeitas a ambientes controlados sendo-lhe fornecidos todos os nutrientes necessários, para além da rega.

Em relação aos teores de cinza nas plantas silvestres estudadas, constata-se de imediato que são elevados podendo prever-se uma boa composição mineral. Na **Tabela 3** é possível observar a diferença nos teores de cinza entre a mostarda-dos-campos (*Sinapis arvensis*) (2,45 g/ 100 g de massa fresca) e as nabiças (0,81 g/ 100 g de parte edível), assim como entre a serralha-macia (*Sonchus oleraceus*) (1,58 g/ 100 g de massa fresca) e a alface (0,65 g / 100 g de parte edível). No entanto, segundo dados do Danish Food Composition Databank-ed.7.01, os teores de cinza por 100 g de parte edível do ruibarbo (1,50 g) e da acelga-comum (1,60 g) apesar de inferiores aos da labaga-crespa (*Rumex crispus*) (1,75 g) e da acelga-brava (*Beta maritima*) (2,24 g) não apresentam uma diferença tão elevada como os anteriores.

Tabela 3. Teores de humidade e cinza das folhas das espécies estudadas (*Rumex crispus* (labaga-crespa), *Sinapis arvensis* (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* (serralha-macia)) e das espécies comuns comparativas (*Rheum rhabarbarum* (ruibarbo), *Brassica napus* (nabiças), *Beta vulgaris* (acelga-comum) e *Lactuca sativa* (alface)).

	<i>Rumex crispus</i> (labaga- crespa)	<i>Rheum rhabarbarum</i> (ruibarbo)	<i>Sinapis arvensis</i> (mostarda- dos- campos)	<i>Brassica napus</i> (nabiças)	<i>Beta maritima</i> (acelga- brava)	<i>Beta vulgaris</i> (acelga- comum)	<i>Sonchus oleraceus</i> (serralha- macia)	<i>Lactuca sativa</i> (alface)
Humidade ¹	80,23	90,50 ²	83,14	91,30 ³	85,91	92,70 ²	88,36	95,90 ³
Cinza ¹	1,75	1,50 ²	2,45	0,81 ³	2,24	1,60 ²	1,58	0,65 ³

¹ g/ 100 g de massa fresca

² Danish Food Composition Databank-ed.7.01

³ INSA

Ao nível da composição mineral das plantas silvestres, verifica-se que praticamente todos os elementos minerais se encontram numa quantidade bastante superior, comparativamente, com os produtos hortícolas comuns. O cobre e o manganês dos produtos hortícolas comuns não foram comparados com as amostras da *Sinapis arvensis* e do *Sonchus oleraceus*, uma vez que, esses valores não estão disponíveis através do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

A labaga-crespa (*Rumex crispus*) e a mostarda-dos-campos (*Sinapis arvensis*) quando comparadas, respectivamente, com o ruibarbo e as nabiças apresentam teores de fósforo, sódio, potássio, magnésio, ferro e zinco muito superiores, como se pode observar nas **Figuras 9 e 10**.

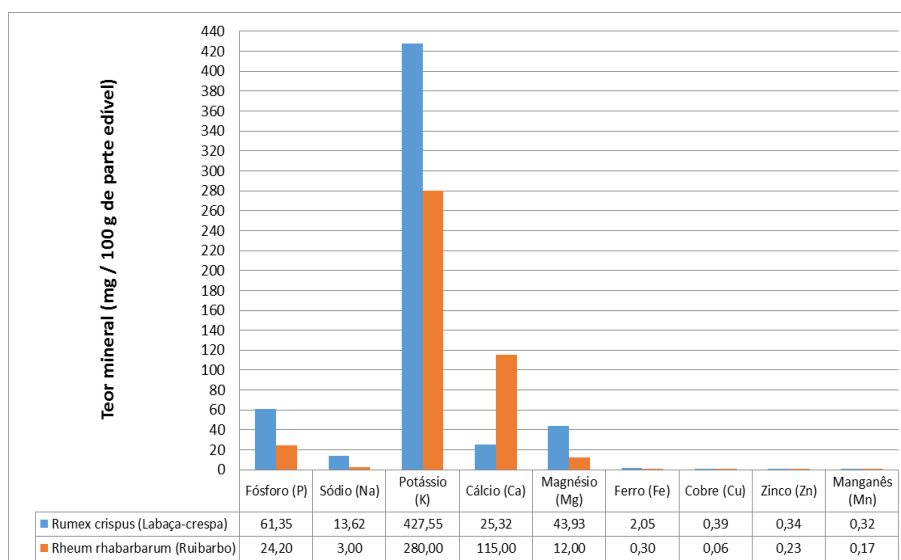


Figura 9. Composição mineral de *Rumex crispus* e *Rheum rhabarbarum*.

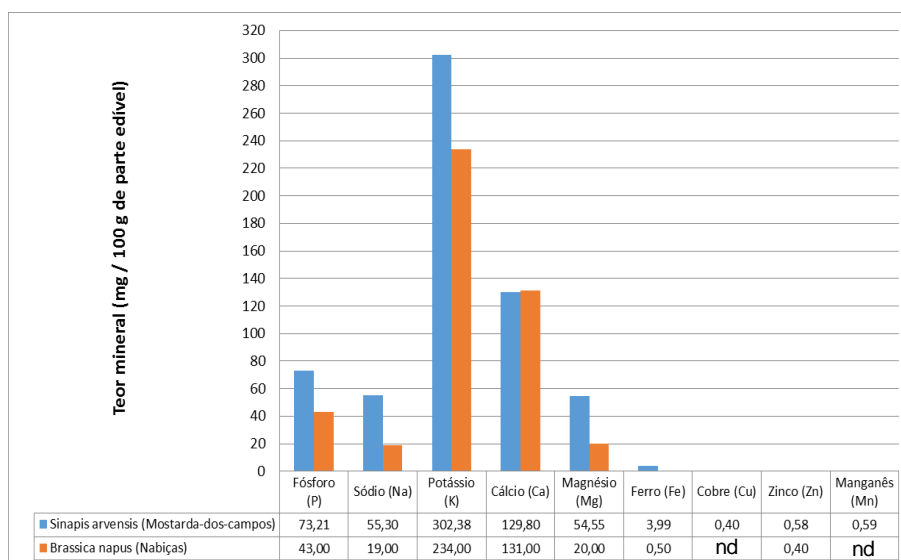


Figura 10. Composição mineral de *Sinapis arvensis* e *Brassica napus*.

Na acelga-brava (*Beta maritima*) os elementos com maior destaque são o sódio, o magnésio e o ferro como se verifica pela **Figura 11**.

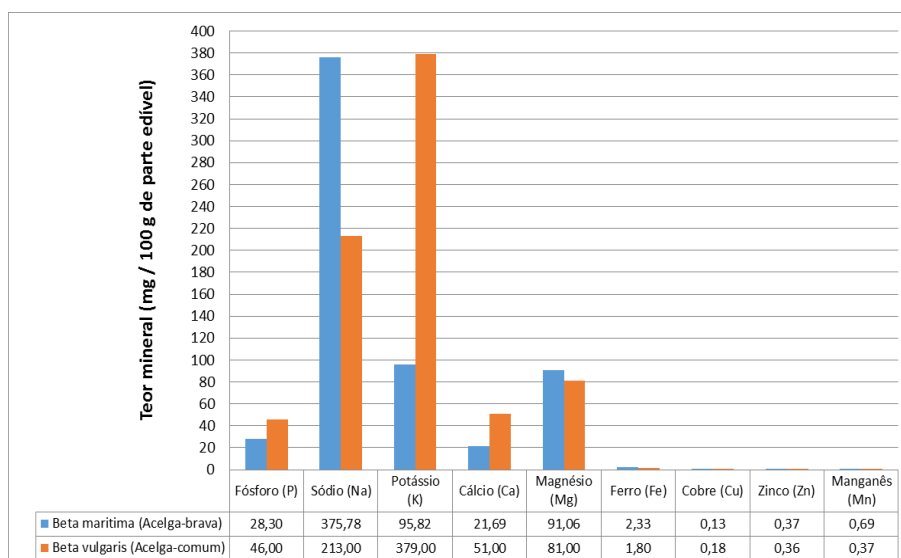


Figura 11. Composição mineral de *Beta maritima* e *Beta vulgaris*.

A serralha-macia (*Sonchus oleraceus*) em comparação com a alface apresenta maior relevância nos teores de fósforo, sódio, ferro e zinco (**Figura 12**).

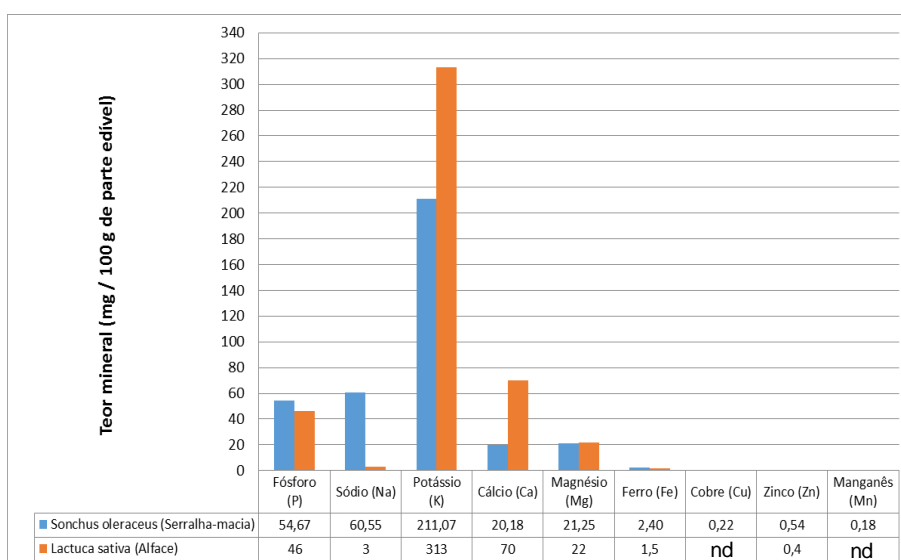


Figura 12. Composição mineral de *Sonchus oleraceus* e *Lactuca sativa*.

Estes resultados indicam que a nível mineral, as plantas silvestres estudadas são bastante relevantes para alimentação, sendo essencialmente uma boa fonte de potássio, sódio, magnésio, ferro e zinco. Contudo, todos os produtos hortícolas comuns apresentam um teor de cálcio superior.

10.2. Teor de compostos fenólicos e actividade antioxidante

O teor de compostos fenólicos totais e a actividade antioxidante determinada pelos métodos de captação dos radicais 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) e do poder redutor (FRAP) apresentam-se na **Tabela 4**. Estes valores foram obtidos com base nas curvas de calibração presentes no **Anexo I**.

Tabela 4. Teor de compostos fenólicos totais e actividade antioxidante (média \pm desvio-padrão, n=3). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

	<i>Rumex crispus</i>	<i>Sinapis arvensis</i>	<i>Beta maritima</i>	<i>Sonchus oleraceus</i>
Compostos Fenólicos ¹	891,55 \pm 14,12 a	111,52 \pm 0,72 c	265,97 \pm 14,94 b	105,84 \pm 2,49 c
DPPH (% RSA)	89,44 \pm 0,43 a	72,52 \pm 2,02 c	40,55 \pm 3,33 b	72,38 \pm 3,86 c
TEAC ²	8,15 \pm 0,04 a	6,56 \pm 0,18 c	3,67 \pm 0,30 b	6,54 \pm 0,35 c
FRAP ³	1,644 \pm 0,11 a	0,206 \pm 0,01 b	0,142 \pm 0,02 b	0,147 \pm 0,02 b

¹ mg equivalentes de ácido gálico / g massa seca

² mol equivalentes de Trolox/ g massa seca

³ mmol Fe²⁺/ g de massa vegetal seca

Das plantas estudadas, verifica-se que o *Rumex crispus* apresenta uma elevada quantidade de compostos fenólicos, seguindo-se a *Beta maritima*. A *Sinapis arvensis* e o *Sochus oleraceus* possuem um valor idêntico e mais baixo em comparação com as espécies anteriores.

Deve realizar-se sempre mais do que um método de determinação da actividade antioxidante, de forma a ter em conta os vários modos de acção dos compostos antioxidantes (Dudonné *et al.*, 2009). Pelos resultados obtidos, pode verificar-se que os métodos apresentam uma correlação, sendo o *Rumex crispus* a espécie que apresenta maior actividade antioxidante, seguindo-se a *Sinapis arvensis* e o *Sonchus oleraceus*. Estes dados indicam uma concatenação entre a quantidade de compostos fenólicos e a sua capacidade de captação de radicais livres e de redução férrica. No entanto, a *Beta maritima* revela uma menor actividade antioxidante apesar do elevado teor obtido em compostos fenólicos totais.

Comparando as plantas estudadas com os produtos hortícolas comuns, verifica-se que o teor de compostos fenólicos totais (mg EAG/ g de massa seca) na mostarda-dos-campos (*Sinapis arvensis*) (111,52) e na serralha-macia (*Sonchus oleraceus*) (105,84) é, na devida ordem, muito superior em relação às nabiças (17,46) e à alface (10,4 – 13,09) adquirida em supermercado (Liu *et al.*, 2007; Batista *et al.*, 2011; USDA). A labança-crespa (*Rumex crispus*) e a acelga-brava (*Beta maritima*), por g de amostra fresca, contêm respectivamente 176,26 e 37,48 mg EAG, sendo a diferença com o

ruibarbo (13,2 mg EAG) superior à da acelga-comum de folhas brancas (8,3 mg EAG) (Pyo *et al.*, 2004; USDA).

Relativamente à actividade captadora de radicais DPPH, o *Rumex crispus* foi aquele que apresentou maior capacidade antioxidante (89,44%), seguido da *Sinapis arvensis* (72,52%) que comparativamente à *Brassica napus* (90%) registou uma actividade inferior, tal como a *Beta maritima* (40,55%) em analogia à *Beta vulgaris* de folha branca (75%) (Batista *et al.*, 2011; Cvjetko *et al.*, 2009; Pyo *et al.*, 2004). Por último, o *Sonchus oleraceus* (72,38%) registou uma actividade bastante maior que a *Lactuca sativa* L. var. *Iceberg* (12,8%) comprada no supermercado (Liu *et al.*, 2007).

O teor de compostos antioxidantes pelo método FRAP, permite verificar valores superiores em todas as plantas silvestres, destacando-se a labaga-crespa (*Rumex crispus*) que apresenta uma diferença na ordem dos 98% em relação ao ruibarbo (Figura 13).

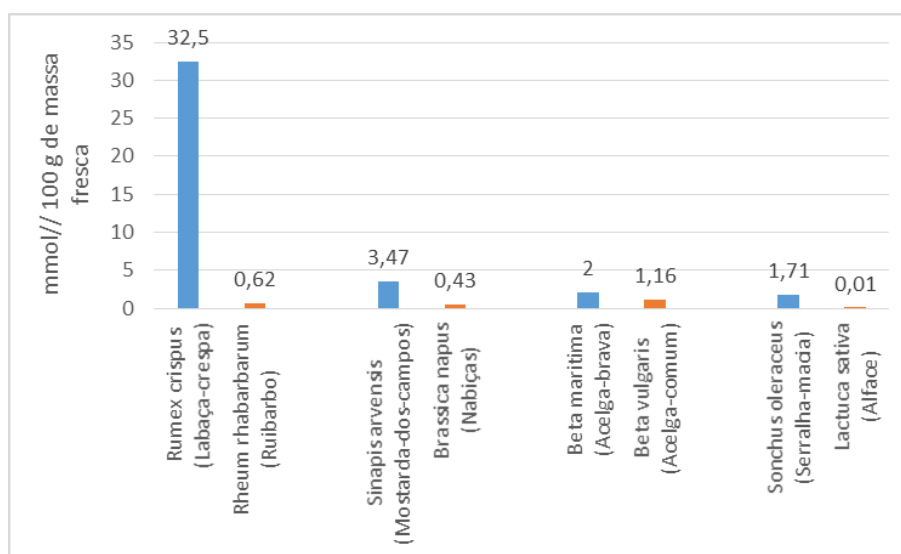


Figura 13. Comparação da actividade antioxidante pelo método FRAP entre as plantas silvestres e os produtos hortícolas comuns (Pyo, 2004; Carlsen *et al.*, 2010).

10.3. Análise de lectinas

10.3.1. Caracterização polipeptídica das diferentes espécies estudadas: *Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*

10.3.1.1. Determinação da concentração proteica dos extractos

Para a análise de lectinas, nos extractos de folhas das plantas em estudo, procedeu-se inicialmente à quantificação do teor proteico pelo método de Bradford e, à análise do perfil polipeptídico por SDS-PAGE-NR e SDS-PAGE-R.

Os resultados da concentração proteica dos extractos de folhas cruas e a +100°C, durante 15 min e 30 min apresentam-se na **Tabela 5**. Estes resultados foram obtidos por interpolação em curvas de calibração presentes no **Anexo II**.

Tabela 5. Avaliação do teor proteico (g/ 100 g de massa fresca) das espécies em estudo, realizado em diferentes condições de tempo e temperatura.

Espécies	Condições de tratamento	Folhas (g)	Volume de extracto (mL)	Concentração proteica (µg/ µL)	Concentração final (g/ 100 g massa fresca)
<i>Rumex crispus</i>	Cru	11,71	70	1,039	0,621
	100 °C – 15 min	50,20	33	1,928	0,127
	100 °C – 30 min	50,20	33	2,455	0,161
<i>Sinapis arvensis</i>	Cru	11,22	70	6,909	4,310
	100 °C – 15 min	50,30	41	2,285	0,186
	100 °C – 30 min	50,30	28	1,300	0,072
<i>Beta maritima</i>	Cru	11,18	70	5,008	3,136
	100 °C – 15 min	50,10	49	2,023	0,198
	100 °C – 30 min	50,10	44	2,325	0,204
<i>Sonchus oleraceus</i>	Cru	11,11	70	2,241	1,412
	100 °C – 15 min	50,35	49	2,464	0,240
	100 °C – 30 min	50,35	43	1,832	0,157

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que nas folhas cruas a *Sinapis arvensis* e a *Beta maritima* apresentam um teor proteico mais elevado em relação às restantes espécies. No entanto, quando submetidas a uma temperatura elevada estas duas espécies registam um decréscimo acentuado do teor proteico, na ordem dos 98,3% e 93,5% respectivamente, o que se poderá traduzir numa maior susceptibilidade proteica destas espécies a condições de tempo/temperatura elevadas. Porém, o teor proteico da *Beta maritima* quando sujeita a +100 °C, resiste ao prolongamento do tempo não se registando alterações consideráveis. Quanto aos extractos de folhas do *Rumex crispus* e *Sonchus oleraceus*, as diferentes condições de tratamento provocaram um decréscimo do teor proteico, na ordem dos 74,0% e 88,9% respectivamente, significando que as proteínas constituintes destas espécies apresentam uma maior resistência ao tratamento térmico em relação às restantes.

Comparando as plantas estudadas com os produtos hortícolas comuns, verifica-se que o teor proteico das folhas cruas (g/ 100 g de massa fresca) na mostarda-dos-campos (*Sinapis arvensis*) (4,3) e na acelga-brava (*Beta maritima*) (3,1) é, na devida ordem, muito superior em relação às nabijas (2,4) e à acelga-comum (1,8). Contudo, a labaga-crespa (*Rumex crispus*) (0,6 g) apresenta um teor proteico inferior ao ruibarbo (0,9 g), tal como a serralha-macia (*Sonchus oleraceus*) (1,4 g) em analogia à alface (1,8 g) (INSA; Danish Food Composition Databank-ed.7.01).

10.3.1.2. Avaliação do perfil polipeptídico e análise proteómica dos extractos crus

A caracterização do perfil polipeptídico das amostras foi realizada por electroforese SDS-PAGE-NR e SDS-PAGE-R com o objectivo de avaliar a complexidade do perfil polipeptídico, a representatividade de bandas polipeptídicas e a presença de pontes persulfureto. A análise proteómica dos extractos (análise 2D), permite obter uma caracterização proteómica mais completa, ficando a conhecer-se a massa molecular, o número de subunidades, as isoformas e, o ponto isoeléctrico dos péptidos constituintes das folhas das plantas estudadas.

A análise electroforética por SDS-PAGE-NR (**Figura 14 (A)**) revela que, o extracto de folhas cruas do *Rumex crispus* apresenta um perfil abrangente de bandas polipeptídicas com massas moleculares dos 10 aos 75 kDa. Neste perfil verificam-se numerosas bandas bem diferenciadas, destacando-se com alguma representatividade uma banda com cerca de 14 kDa. Na respectiva análise em condições redutoras (**Figura 14 (B)**), observa-se uma maior definição e complexidade devido à quebra das pontes persulfureto e, neste perfil, a banda destacada no painel A apresenta-se reduzida. A

análise proteómica (2D) (**Figura 14 (C)**), permite afirmar que a folha crua do *Rumex crispus* é constituída por péptidos que se distribuem maioritariamente na zona de pI 5-8, realçando-se duas isoformas da banda com cerca de 50 kDa (painel C (1)), e um *spot* bem definido, no agrupamento 2 do painel C, em que a banda de maior representatividade é de ~34 kDa (painel B). A banda de maior representatividade na análise bidimensional tem cerca de 14 kDa, sendo o *spot* peptídico com maior destaque (painel B e C (4)).

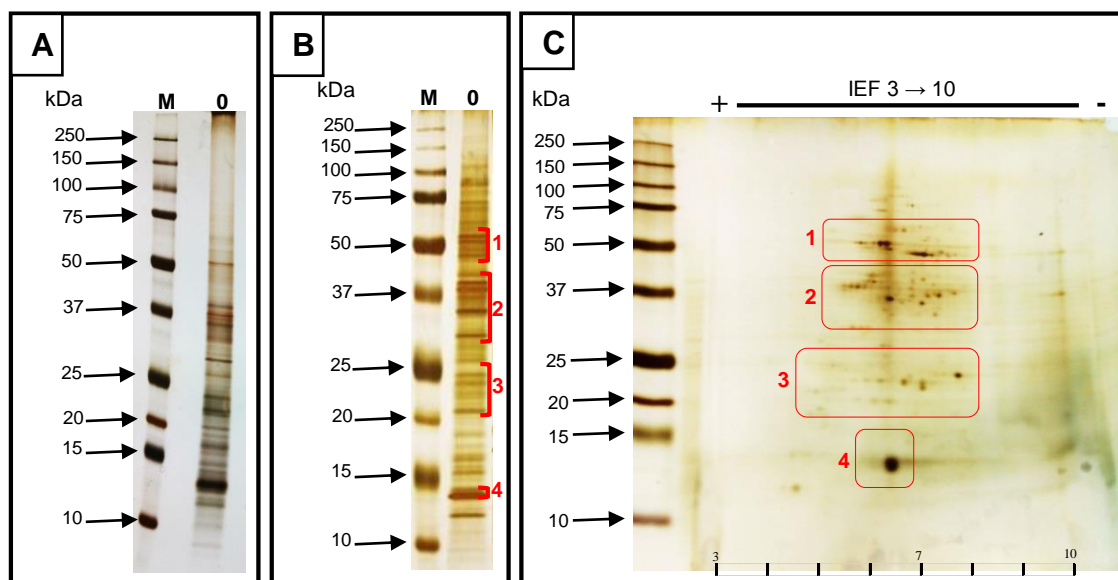


Figura 14. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de *Rumex crispus*.

A – SDS-PAGE-NR, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). B – SDS-PAGE-R, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). C – Análise proteómica 2D IEF/ SDS-PAGE-R de 500 µg de extracto proteico das folhas cruas e 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad).

Na *Sinapis arvensis*, pode observar-se um perfil polipeptídico simples e abrangente, apresentando bandas desde os 10 até aos 150 kDa (**Figura 15**). Nos extractos das folhas cruas, destaca-se a banda dupla (1) de $\sim 45 \pm 2$ kDa e a banda (4) de $\sim 12,5 \pm 1$ kDa sendo, muito provavelmente, referentes à enzima ribulose-bisfosfato carboxilase/oxigenase (rubisco) que segundo Ma *et al.* (2009) apresenta uma massa molecular nativa de ~560 kDa. Comparando os painéis A e B (**Figura 15**), verifica-se que para as amostras de folhas cruas, após redução, o perfil polipeptídico ficou mais complexo com um aumento do número de bandas, indicando a presença de pontes persulfureto. No entanto, os polipéptidos (1) e (4) parecem não ter sofrido redução. Analisando o painel C (bidimensional), observa-se que os péptidos das folhas de *Sinapis arvensis* distribuem-se maioritariamente na zona de pI 6-8, apesar de alguns *spots* sem grande representatividade se encontrarem na zona acídica e básica. No geral,

destacam-se as isoformas com cerca de 48 kDa, sendo representadas por um *spot* denso com um *pI* de 6,5-7 (painel C (1)) e duas isoformas correspondentes à banda com cerca de 12,5 kDa (painel C (4)). Entre os 15 e os 45 kDa (painel C (2) e (3)) verificam-se diversos péptidos constituídos por diferentes isoformas.

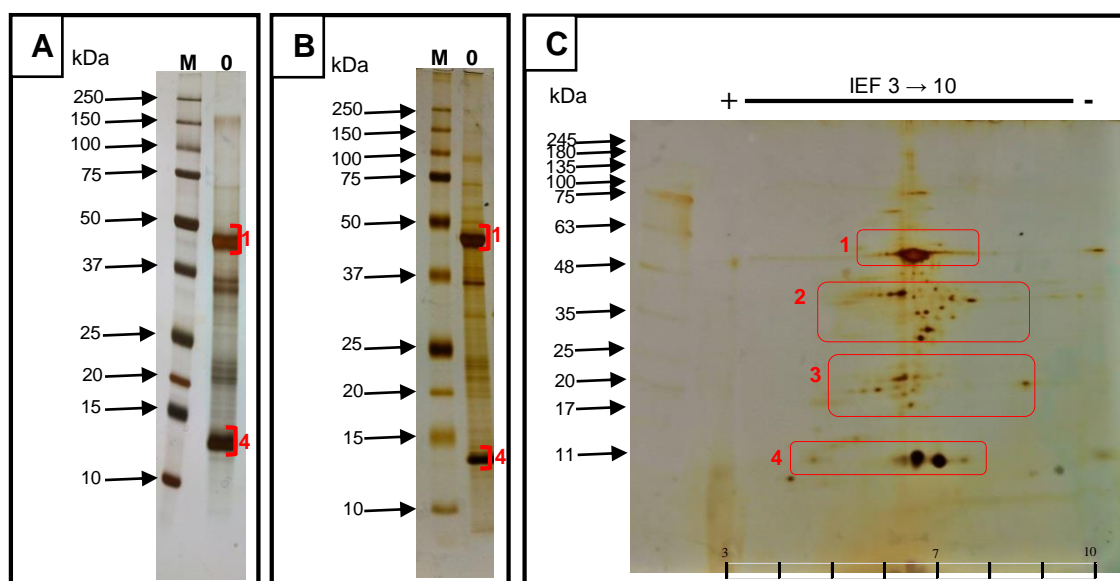


Figura 15. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de *Sinapis arvensis*.

A – SDS-PAGE-NR, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). B – SDS-PAGE-R, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). C – Análise proteómica 2D IEF/ SDS-PAGE-R de 350 µg de extracto proteico das folhas cruas e 3 µL do marcador de massa molecular NZY Colour Protein Marker II (Nzytech).

Nas amostras de folhas cruas da *Beta maritima*, observam-se perfis complexos e abrangentes com massas moleculares até aos 150 kDa, apresentando numerosas bandas polipeptídicas de baixa massa molecular (**Figura 16**). Nesta amostra, registam-se igualmente duas bandas mais representativas, possivelmente correspondentes à rubisco. Comparando os painéis A e B, constata-se que em condições redutoras, obtém-se um perfil mais definido e constituído por bandas mais diferenciadas, comprovando-se a existência de pontes persulfureto. No painel C observa-se uma distribuição dos péptidos maioritariamente na zona de *pI* 5,5-7,5, destacando-se diversas isoformas com cerca de 48 kDa (1), em analogia com o resultado obtido para a *Sinapis arvensis*. No painel C, também se verificam diferentes isoformas, nos agrupamentos 3 e 2, correspondentes respectivamente, à banda com cerca de 13 kDa (painel B (3)) e entre os 20 e os 48 kDa (painel B (2)).

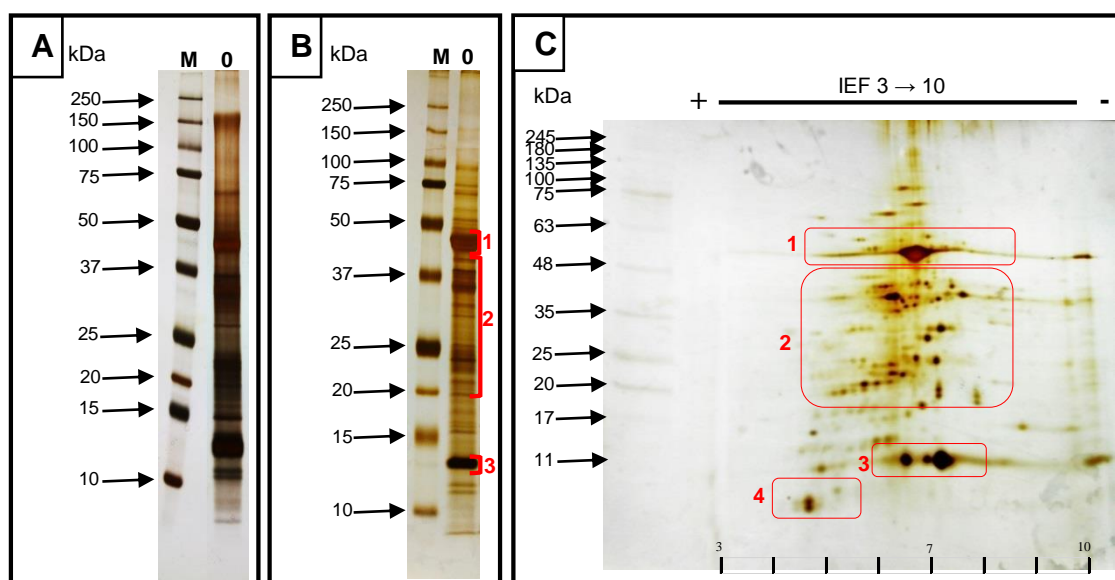


Figura 16. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de *Beta maritima*.

A – SDS-PAGE-NR, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). B – SDS-PAGE-R, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). C – Análise proteómica 2D IEF/ SDS-PAGE-R de 350 µg de extracto proteico das folhas cruas e 3 µL do marcador de massa molecular NZY Colour Protein Marker II (Nzytech).

Perante a **Figura 17**, constata-se que a amostra do *Sonchus oleraceus*, apresenta um perfil polipeptídico mais simplificado com uma abrangência polipeptídica até aos 75 kDa. Estas bandas, no entanto, não revelam grande representatividade sendo bastante diversificadas. Comparando os perfis dos painéis A e B, observa-se que na presença do agente redutor os polipéptidos das folhas cruas possuem poucas pontes persulfureto, uma vez que o perfil é bastante similar ao perfil descrito no painel A. A análise bidimensional das folhas cruas (painel C), revela-se bastante simples e com uma distribuição dos péptidos maioritariamente na zona neutra (pI 6-7,5). Destacando-se alguns *spots* representativos, situados num pI entre 6 e 7, com massas moleculares de aproximadamente 50 kDa (painel C (1)) e duas isoformas com cerca de 24 kDa (painel C (2)) e com 12 kDa (painel C (3)).

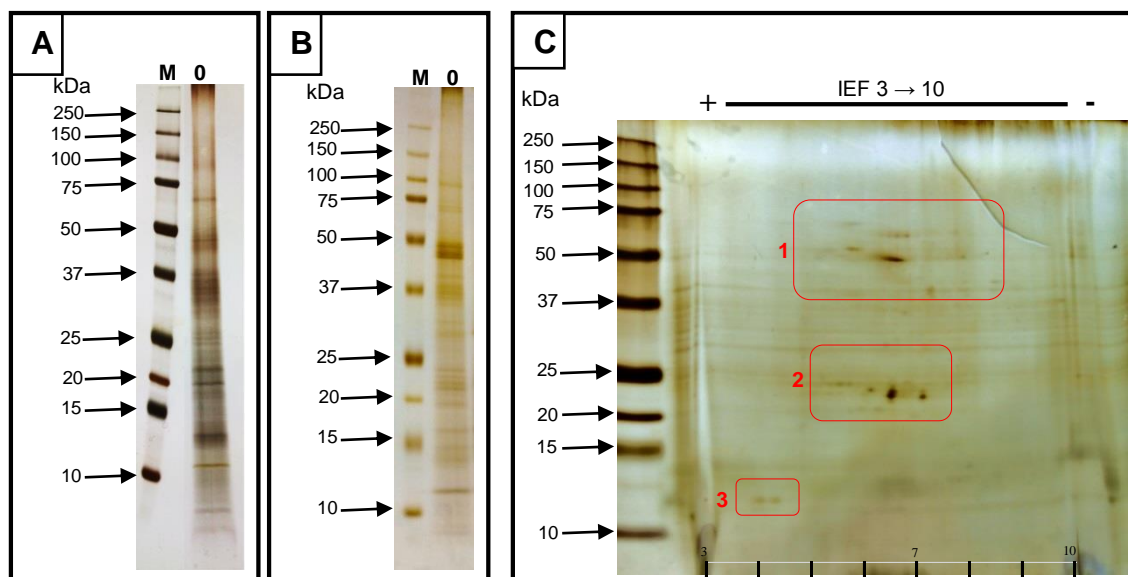


Figura 17. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico das folhas cruas de *Sonchus oleraceus*.

A – SDS-PAGE-NR, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). B – SDS-PAGE-R, aplicou-se 30 µg de extracto proteico (0). C – Análise proteómica 2D IEF/ SDS-PAGE-R de 700 µg de extracto proteico das folhas cruas e 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad).

De entre todas as espécies estudadas, verifica-se que as folhas cruas da *Beta maritima* são as que apresentam um perfil polipeptídico mais complexo, contrariamente ao perfil polipeptídico do *Sonchus oleraceus*, aparentemente de elevada simplicidade, mesmo com a aplicação, na análise bidimensional de 700 µg de proteína.

10.3.1.3. Avaliação do perfil polipeptídico das espécies em estudo quando sujeitas às condições usuais na confecção de sopas tradicionais

As folhas das diferentes espécies (*Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*) foram sujeitas a uma temperatura de +100 °C durante 15 e 30 min, condições usuais na confecção de sopas tradicionais. Fez-se a averiguação das alterações proteicas ocorridas, mediante análise dos respectivos perfis polipeptídicos, em condições não redutoras e redutoras.

A **Figura 18**, corresponde aos extractos das folhas de *Rumex crispus* confeccionadas durante 15 e 30 min a +100 °C (15' e 30', respectivamente). O perfil electroforético, em condições não redutoras (painel A) e redutoras (painel B), das amostras sujeitas a tratamento térmico, revela-se idêntico para os dois parâmetros de temperatura, nas referidas condições de não redução ou redução. Em condições não redutoras (painel A), as amostras obtidas após 15 e 30 min de fervura, apresentam

aparentemente uma enorme simplicidade no perfil polipeptídico, revelando desnaturação proteica, que se justifica pelo aumento dos péptidos de baixo massa molecular com bandas situadas entre os 10 e os 25 kDa. Já em condições redutoras nas amostras sujeitas a tratamento térmico, apesar de ambos os perfis se revelarem idênticos, observa-se um perfil de massa molecular mais abrangente com bandas dos 10 aos 50 kDa, devido à ruptura das pontes persulfureto. No entanto, estes perfis apresentam uma simplificação relativamente à amostra não sujeita a tratamento térmico (0'), revelando igualmente degradação proteica. As amostras (15') e (30'), apresentam algumas bandas representativas, localizadas em dois intervalos de massa molecular diferentes, 37-50 kDa (painel B (1)) e 15-20 kDa (painel B (2)), contrariamente à amostra (0') que apresenta um perfil mais uniforme apesar de mais abrangente.

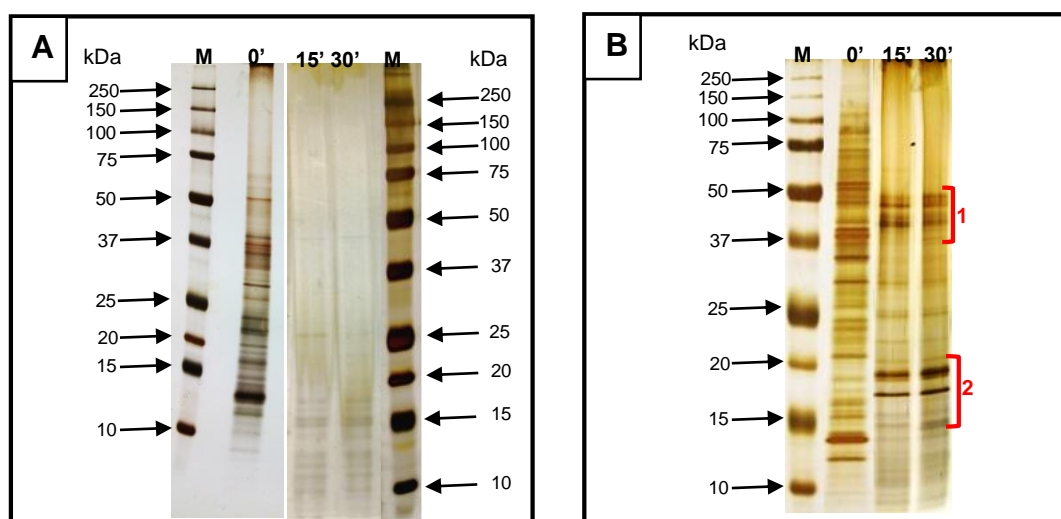


Figura 18. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de *Rumex crispus*, correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.

A – SDS-PAGE-NR, aplicaram-se 30 µg, 50 µg e 50 µg de extracto proteico (0', 15' e 30', respectivamente). B – SDS-PAGE-R, aplicou-se o mesmo teor proteico, 30 µg por extracto. Aplicou-se em cada gel, 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) (M).

Na **Figura 19** verifica-se que nas amostras de *Sinapis arvensis*, em condições não redutoras (painel A) e redutoras (painel B), uma temperatura elevada provoca a inactivação da enzima rubisco (~47 kDa no estado cru (0')), explicando-se assim a ausência destas bandas nas amostras fervidas. Relativamente às folhas confeccionadas, verifica-se uma maior concentração de bandas de baixa massa molecular, possivelmente, este facto deve-se a uma degradação da estrutura das proteínas em péptidos mais pequenos com massas moleculares inferiores. Comparando os painéis A e B, verifica-se que nas amostras (15' e 30') sujeitas a +100 °C tanto em condições não redutoras como redutoras, os perfis mantiveram-se semelhantes,

apresentando bandas de igual representatividade, isto é, de ~31 kDa, 24 e 23 kDa e no intervalo 13-17 kDa. Estes resultados revelam que o β -mercaptoetanol parece não ter exercido grande redução (painel B), o que se traduz num perfil polipeptídico com reduzidas pontes persulfureto.

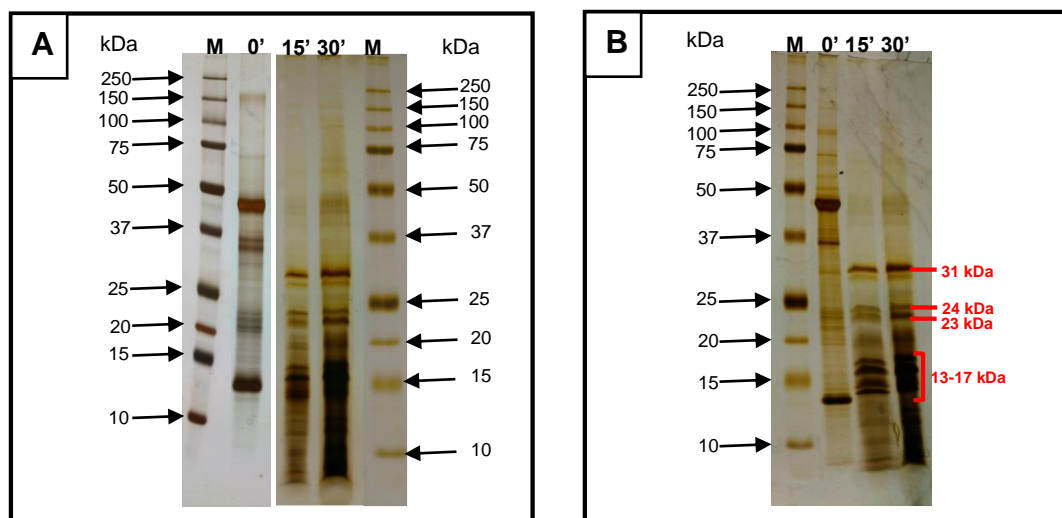


Figura 19. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de *Sinapis arvensis*, correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.

A – SDS-PAGE-NR, aplicaram-se em todos os poços 30 µg dos respectivos extractos proteicos. B – SDS-PAGE-R, aplicaram-se, igualmente, em todos os poços 30 µg de extracto proteico. Aplicaram-se, 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) (M).

Nas amostras confeccionadas de *Beta maritima*, o perfil é idêntico, independentemente do tempo e das condições testadas (Figura 20). Verifica-se que nos perfis das amostras sujeitas a +100 °C as bandas com cerca de 30 kDa são comuns às amostras anteriores da *Sinapis arvensis*, podendo por este motivo especular-se serem correspondentes à banda de cerca de 47 kDa das amostras cruas. No perfil polipeptídico dos extractos das folhas sujeitas a tratamento térmico (amostras 15' e 30'), em condições de redução, observa-se um perfil idêntico, revelando normalmente a ausência de pontes persulfureto.

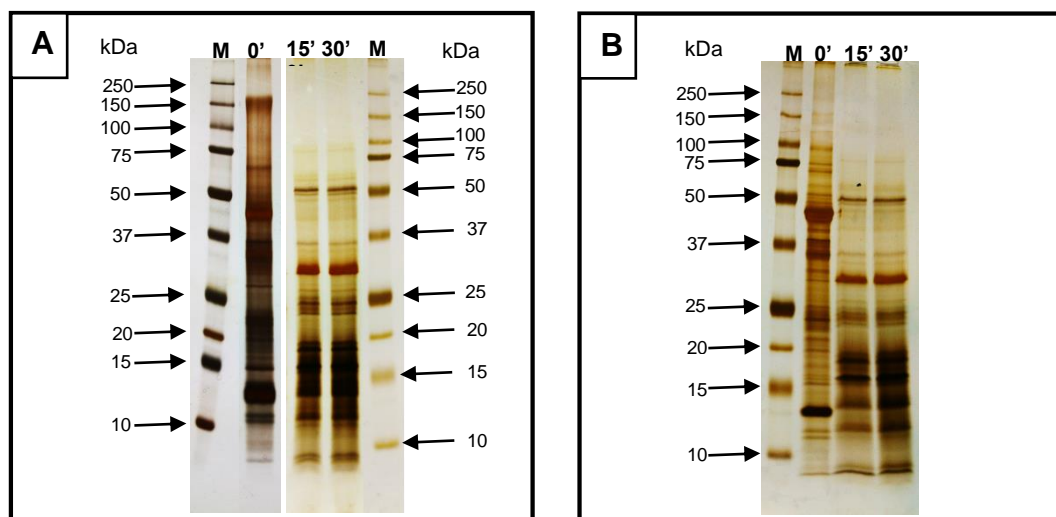


Figura 20. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de *Beta maritima*, correspondendo **0'** às folhas cruas, **15'** às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e **30'** às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.

A – SDS-PAGE-NR, aplicaram-se em todos os poços 30 µg de extracto proteico. B – SDS-PAGE-R, aplicaram-se, igualmente, em todos os poços 30 µg de extracto proteico. Aplicou-se em cada gel, 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) (**M**).

Em relação às amostras do *Sonchus oleraceus* (**Figura 21**), as folhas sujeitas a +100 °C, a diferentes tempos (15 e 30 min), em ambas as condições (SDS-PAGE-NR e SDS-PAGE-R), apresentam um perfil semelhante que se caracteriza essencialmente por bandas de baixa massa molecular (< 30 kDa) (painel A e B). Tal como nas amostras das folhas cruas, esta é uma espécie que apresenta um perfil simples e sem bandas com grande representatividade revelando, no entanto, a existência de pontes persulfureto, tornando-se evidente quer no estado cru (0') como nas amostras com tratamento térmico (painel A e B).

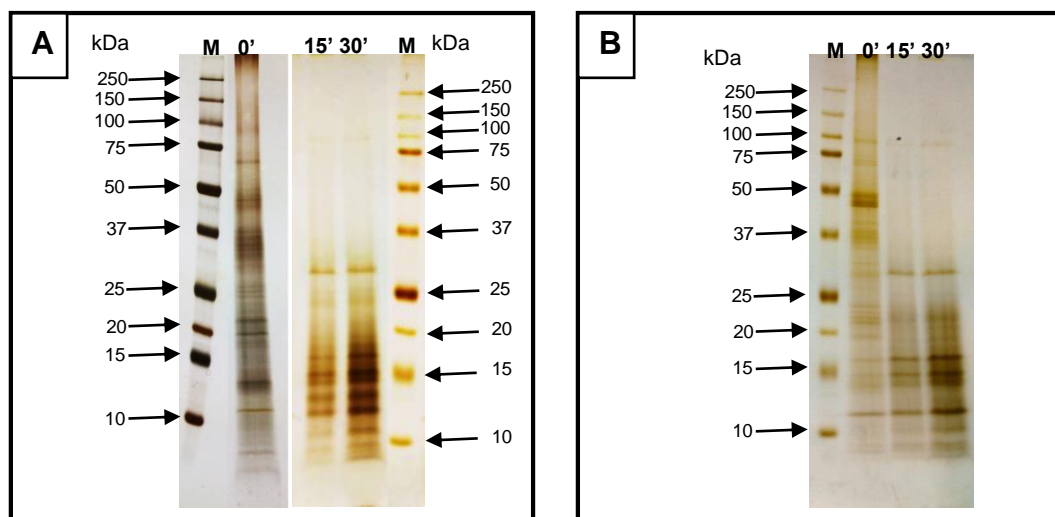


Figura 21. Análise dos perfis polipeptídicos do extracto proteico de *Sonchus oleraceus*, correspondendo 0' às folhas cruas, 15' às folhas sujeitas a +100 °C durante 15 min e 30' às folhas submetidas à mesma temperatura durante 30 min.

A – SDS-PAGE-NR, aplicaram-se em todos os poços 30 µg dos respectivos extractos proteicos
B – SDS-PAGE-R, aplicaram-se em todos os poços 30 µg de extracto proteico. Aplicou-se em cada gel, 3 µL do marcador de massa molecular Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad) (M).

Em todas as amostras, verifica-se que os extractos das folhas submetidas a +100 °C, durante 15 e 30 min, apresentam o mesmo perfil polipeptídico para cada uma das espécies revelando a mesma influência do tratamento térmico. Pode também constatar-se que entre condições não redutoras e redutoras, as amostras nos diferentes tempos não apresentam alterações a +100 °C, podendo especular-se que uma temperatura elevada durante algum tempo leva à quebra das pontes persulfureto presentes nas proteínas das folhas. Comparando as folhas cruas com as fervidas, em todas as espécies, observa-se que uma temperatura elevada conduz a um perfil com uma maior concentração de bandas de baixa massa molecular (< 50 kDa), evidenciando a destruição das pontes persulfureto e uma possível degradação proteica, resultando em polipéptidos de baixa massa molecular.

10.3.2. Glicodetecção

Os extractos de folhas cruas e a +100 °C durante 30 min, das quatro espécies em estudo, foram preparados para a detecção de glicopolipétidos. As membranas de nitrocelulose que continham os polipéptidos imobilizados dos extractos, foram incubadas com a lectina concanavalina A, com especificidade para o grupo manose/glucose, e com uma glicoproteína (avidina) enzimaticamente activa com a peroxidase de rábano (Avidin-HRP). A enzima ligada ao substrato resulta num produto corado altamente insolúvel (Clegg, 1982). Devido à especificidade glicosídica da Con-A

(manose/ glucose) podem existir diversos tipos de glicoproteínas que não são detectadas. De qualquer modo, este tipo de glicodetecção é o mais representativo.

Na **Figura 22**, comparando os painéis A e B, pode confirmar-se que a transferência dos polipéptidos para a membrana de nitrocelulose foi bem sucedida, uma vez que o Ponceau S corou a membrana de nitrocelulose. Analisando os painéis B e C pode concluir-se que todos os extractos das folhas cruas apresentam bandas glicosiladas.

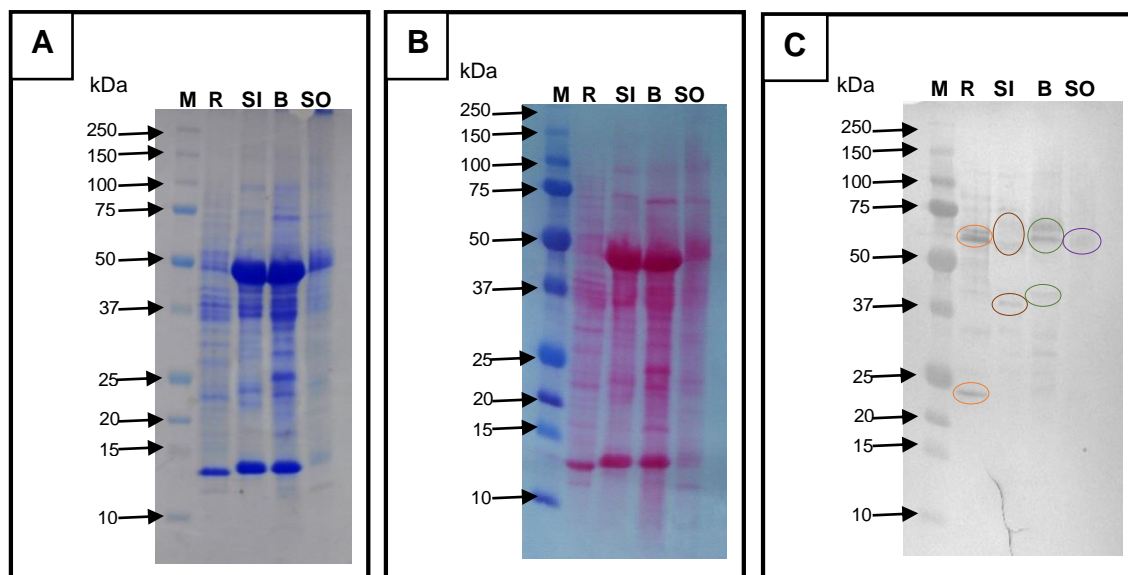


Figura 22. Transferência polipeptídica para detecção de glicoproteínas dos extractos proteicos das folhas cruas de *Rumex crispus* (R), *Sinapis arvensis* (SI), *Beta maritima* (B) e *Sonchus oleraceus* (SO). Aplicaram-se para todas as amostras 300 µg de extracto proteico. A – SDS-PAGE-R corado por Coomassie Brilliant Blue R-250 utilizado como controlo. B – Membrana de nitrocelulose corada pelo Ponceau S após transferência. C – Detecção de bandas glicosiladas por quimioluminescência.

No extracto do *Rumex crispus* as bandas bem definidas entre os 50 e 75 kDa exibem uma forte componente glicosilada, no entanto, apresentam pouca relevância no SDS-PAGE-R e no Ponceau S. Contudo, a banda glicosilada com cerca de 24 kDa (painel C) encontra-se também bem definida nos controlos (painel A e B).

Nas amostras de *Sinapis arvensis* e da *Beta maritima*, destacam-se as bandas glicosiladas entre os 50 e 75 kDa, tal como no *Rumex crispus*. Nestas duas espécies, é igualmente comum e relevante a banda com cerca de 37 kDa, verificando-se pelo gel de controlo (painel A) ser uma banda com alguma representatividade.

Em relação ao *Sonchus oleraceus*, apenas é possível detectar uma banda glicosilada muito ténue com cerca de 68 kDa, podendo verificar-se pelo painel A ser a banda mais representativa desta amostra.

Perante estes resultados é possível que estejam presentes nos extractos em estudo, proteínas com actividade de lectina específicas para os hidratos de carbono manose/ glucose, uma vez que a maioria das lectinas são glicosiladas.

Os resultados obtidos da glicodeteção realizada aos extractos das folhas fervidas, durante 30 min, são apresentados na **Figura 23**. Comparando os painéis A e B pode confirmar-se que a transferência dos polipéptidos para a membrana de nitrocelulose foi bem efectuada. Analisando os painéis B e C pode verificar-se que apenas a *Beta maritima* e o *Sonchus oleraceus* revelaram bandas glicosiladas.

Na *Beta maritima*, a banda com 50 kDa e a de 25 kDa exibem uma forte componente glicosilada (painel C), sendo estas bandas também evidentes e bem definidas no SDS-PAGE-R e no Ponceau S (painel A e B). Relativamente ao *Sonchus oleraceus*, apenas se detecta uma banda muito ténue com cerca de 50 kDa e que não foi corada nos controlos.

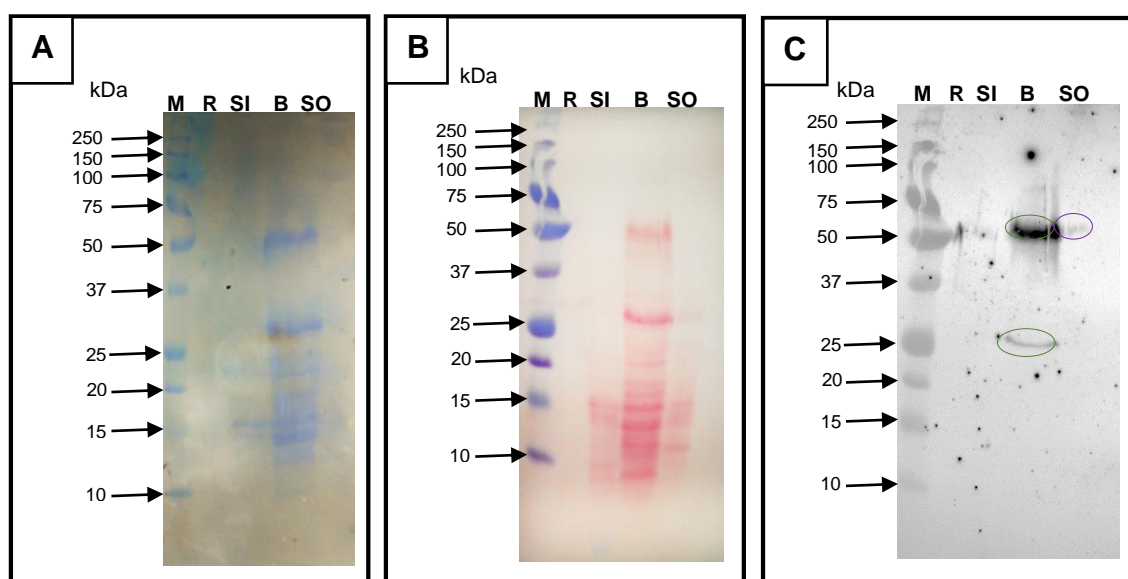


Figura 23. Transferência polipeptídica para detecção de glicoproteínas dos extractos proteicos das folhas sujeitas a +100 °C, durante 30 min, de *Rumex crispus* (R), *Sinapis arvensis* (SI), *Beta maritima* (B) e *Sonchus oleraceus* (SO). Aplicaram-se para todas as amostras 300 µg de extracto proteico. A – SDS-PAGE-R corado por Comassie Brilliant Blue R-250 utilizado como controlo. B – Membrana de nitrocelulose corada pelo Ponceau S após a transferência. C – Detecção de bandas glicosiladas por quimioluminescência.

Comparando a **Figura 22(C)** e a **Figura 23(C)**, pode constatar-se que os extractos de folhas cruas apresentam muito mais bandas glicosiladas do que o extracto das folhas submetidas a tratamento térmico durante 30 min. Na *Beta maritima* as bandas glicosiladas que se revelaram no extracto das folhas fervidas, apresentam uma massa molecular inferior às detectadas no extracto das folhas cruas. No *Sonchus oleraceus*, nas duas condições testadas, a banda polipeptídica revelada possui uma massa

molecular levemente inferior, à detectada no extracto cru, apesar da distorção dos marcadores de massa molecular.

10.3.3. Avaliação da actividade de lectina das espécies em estudo

10.3.3.1. Determinação da actividade hemaglutinante

Nas amostras das folhas cruas e fervidas durante 30 min de *Rumex crispus*, *Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*, detectou-se a actividade hemaglutinante e determinou-se a unidade hemaglutinante (U.H.– concentração mínima de proteína que ainda provoca actividade hemaglutinante).

Em todos os ensaios realizados utilizou-se um controlo negativo (soro fisiológico) e um controlo positivo (concanavalina A).

Na **Figura 24** observam-se os resultados obtidos para as amostras de *Rumex crispus* e verifica-se que, para qualquer dos teores proteicos (100, 300 e 500 µg) e condições ensaiadas (folhas cruas e com tratamento térmico), não há actividade hemaglutinante, uma vez que, todos os poços apresentaram um núcleo de precipitação de eritrócitos rodeado por um sobrenadante transparente e incolor. Este extracto não apresentou por isso, proteínas com especificidade para os receptores glicosilados dos eritrócitos, não se manifestando actividade de lectina.

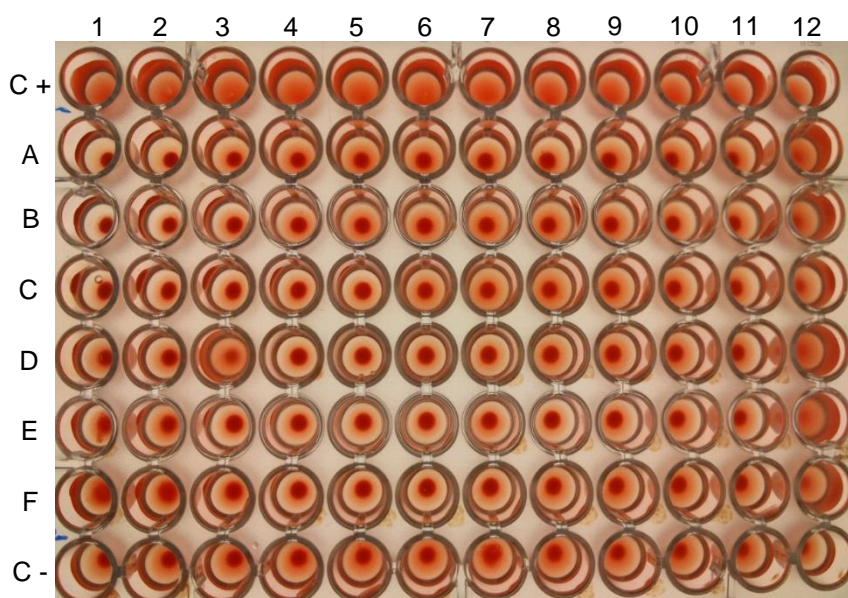


Figura 24. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de *Rumex crispus*. No 1º poço de cada linha adicionaram-se os seguintes teores proteicos: A – 100 µg de folha crua; B – 300 µg de folha crua; C – 500 µg de folha crua; D – 100 µg de folha cozida 30'; E – 300 µg de folha cozida 30'; F – 500 µg de folha cozida 30'. Nos restantes poços (1º ao 12º), procederam-se a diluições seriadas (1:3). Aplicou-se como termo comparativo um controlo positivo (C+) de Con-A e um controlo negativo (C-) de soro fisiológico.

Na **Figura 25**, observa-se o núcleo de precipitação de eritrócitos nas amostras das folhas cruas de *Sinapis arvensis* para os diferentes teores proteicos ensaiados (i.e., 100 µg (A), 300 µg (B) e 500 µg (C)), significando este resultado ausência de actividade hemaglutinante. No entanto, nas amostras de folhas sujeitas a +100 °C durante 30 min, para os teores proteicos de 100 e 300 µg (D e E, respectivamente), verifica-se actividade hemaglutinante nas primeiras diluições das amostras (1:81 e 1:243, respectivamente), enquanto na amostra com 500 µg de proteína (F), se observa actividade hemaglutinante em todas as diluições realizadas. Este extracto revela, assim, uma elevada actividade hemaglutinante e, como tal, a ligação das proteínas tipo lectinas existentes neste extracto, aos receptores glicosilados dos eritrócitos.

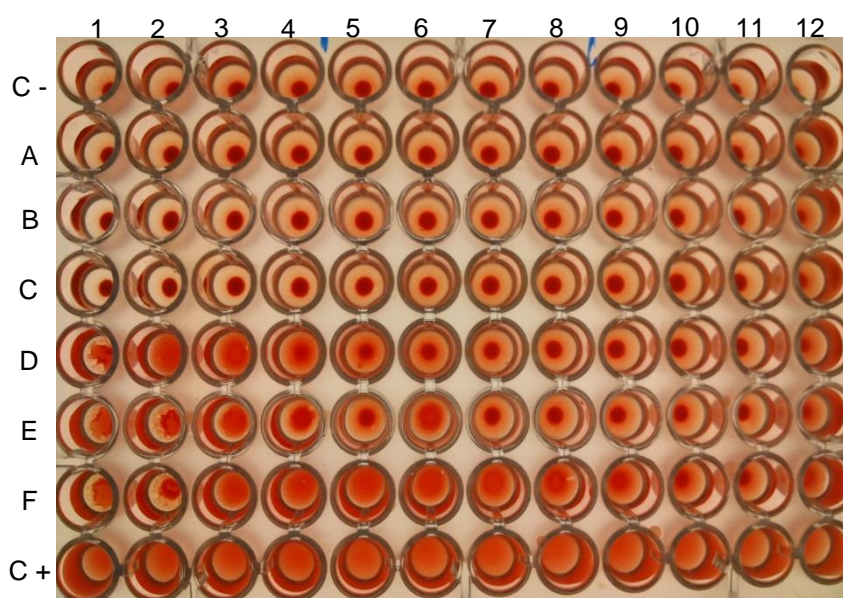


Figura 25. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de *Sinapis arvensis*. No 1º poço de cada linha adicionaram-se os seguintes teores proteicos: A – 100 µg de folha crua; B – 300 µg de folha crua; C – 500 µg de folha crua; D – 100 µg de folha cozida 30'; E – 300 µg de folha cozida 30'; F – 500 µg de folha cozida 30'. Nos restantes poços (1º ao 12º), procederam-se a diluições seriadas (1:3). Aplicou-se como termo comparativo um controlo negativo (C-) de soro fisiológico e um controlo positivo (C+) de Con-A.

Na **Figura 26**, as amostras das folhas cruas de *Beta maritima*, com teores proteicos de 100, 300 e 500 µg, respectivamente, A, B e C, não apresentam actividade hemaglutinante, em qualquer dos teores e diluições efectuadas. Relativamente às amostras submetidas a +100 °C durante 30 min, os extractos das folhas de *Beta maritima*, com teores proteicos de 100, 300 e 500 µg, respectivamente, D, E e F, apresentam actividade hemaglutinante, mas em diferentes diluições do extracto, de acordo com os diferentes teores ensaiados. Sendo assim, para 100 µg registou-se

actividade hemaglutinante até à diluição 1:729, para 300 µg até à diluição 1: 2187, e para 500 µg até à última diluição (1:177147).

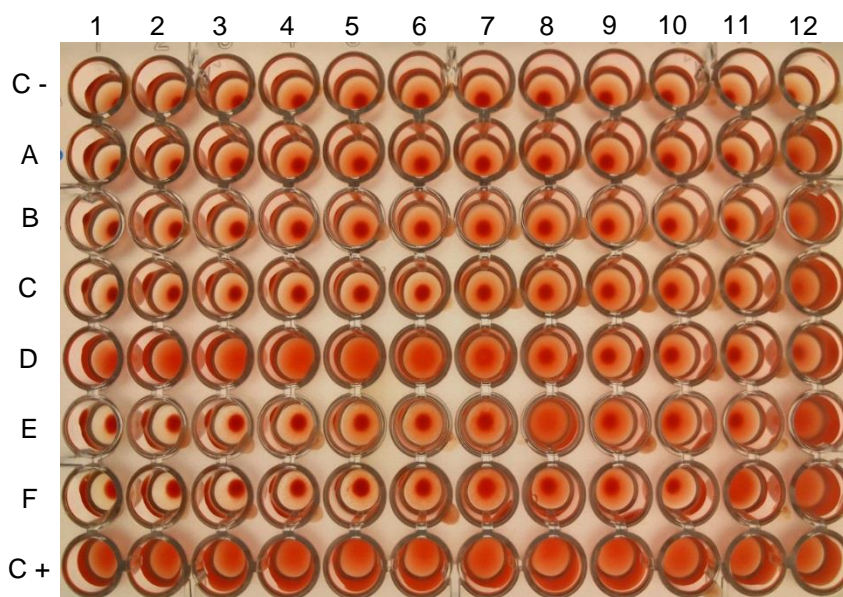


Figura 26. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de *Beta maritima*. No 1º poço de cada linha adicionaram-se os seguintes teores proteicos: A – 100 µg de folha crua; B – 300 µg de folha crua; C – 500 µg de folha crua; D – 100 µg de folha cozida 30'; E – 300 µg de folha cozida 30'; F – 500 µg de folha cozida 30'. Nos restantes poços (1º ao 12º), procederam-se a diluições seriadas (1:3). Aplicou-se como termo comparativo um controlo negativo (C-) de soro fisiológico e um controlo positivo (C+) de Con-A.

Na **Figura 27**, observa-se que em todos os poços com amostra de folha crua de ***Sonchus oleraceus***, para a qual se efectuou 24 diluições seriadas (A1 ao AA12), não se manifestou actividade hemaglutinante. Ao contrário dos poços com amostra de folha fervida durante 30 min, para o mesmo número de diluições (B1 ao BB12), onde se revelou, até à 14ª diluição da amostra, a aderência dos eritrócitos ao fundo da placa formando um revestimento e revelando a existência de actividade hemaglutinante.

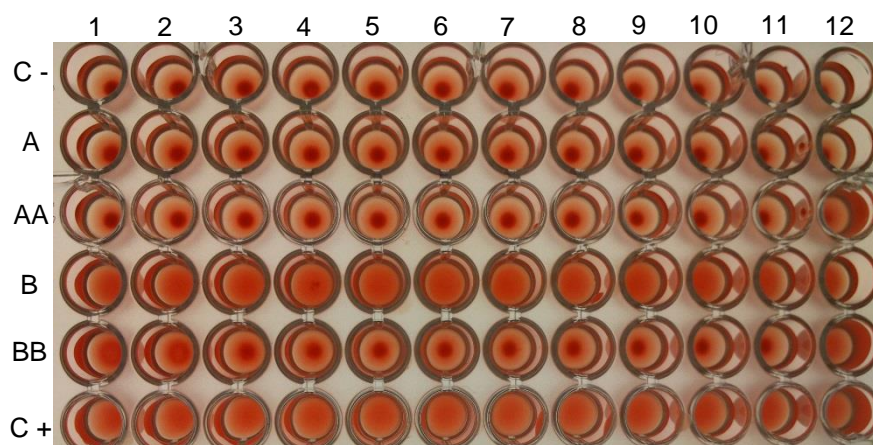


Figura 27. Avaliação da actividade hemaglutinante do extracto proteico de folha de *Sonchus oleraceus*. No 1º poço da linha A, adicionou-se um teor proteico de 20 µg de folha crua e nos restantes poços (A1 ao AA12) procederam-se a diluições seriadas (1:3). No 1º poço da linha B, adicionou-se um teor proteico de 20 µg de folha cozida 30 min e nos restantes poços (B1 ao BB12), procederam-se a diluições seriadas (1:3). Aplicou-se como termo comparativo um controlo negativo (C-) de soro fisiológico e um controlo positivo (C+) de Con-A.

Na **Tabela 6**, apresentam-se os valores da determinação da unidade hemaglutinante (U. H.), dos diferentes extractos proteicos totais das folhas das quatro espécies de plantas estudadas, após 30 min de fervura (+100 °C).

Tabela 6. Determinação da actividade hemaglutinante para os diferentes extractos proteicos estudados, após 30 min à temperatura de ebulição.

Extractos proteicos totais (+100 °C/30 min)	Teor proteico aplicado (µg)	U. H. (µg) ⁽¹⁾
<i>Rumex crispus</i>	100	NO*
	300	NO*
	500	NO*
<i>Sinapis arvensis</i>	100	3,70
<i>Beta maritima</i>	100	0,14
<i>Sonchus oleraceus</i>	20	1,25 x 10 ⁻⁵

(1) Unidade hemaglutinante: concentração mínima de proteína que ainda provoca hemaglutinação numa solução eritrocitária a 4% (v/v).

NO* - hemaglutinação não observada.

Perante os resultados obtidos, verifica-se que o *Rumex crispus*, não apresenta actividade hemaglutinante tanto nas folhas cruas como nas fervidas. Ao contrário das

restantes espécies (*Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*) que nos extractos de folhas cruas não revelaram actividade hemaglutinante, mas que após tratamento térmico manifestaram elevada actividade, principalmente no caso do *Sonchus oleraceus*, cuja U.H. é a menor de todas (U.H.= $1,25 \times 10^{-5}$), registando uma elevada actividade de lectina. A revelação da actividade hemaglutinante é, por vezes difícil, parecendo para a mesma amostra que a proteína perde a sua actividade ao longo do tempo. A estequiometria da reacção é um factor importante, uma vez que, existe uma relação ideal entre a concentração da proteína e a concentração de lectina para uma manifestação máxima de actividade hemaglutinante. No entanto, após novos ensaios com aplicação de um teor proteico inferior (20 µg) para as amostras de folhas cruas de *Sinapis arvensis* e *Beta maritima* e procedendo a 24 diluições seriadas, os resultados mantiveram-se, portanto nos extractos de folhas cruas não se manifestou actividade hemaglutinante, mas nos extractos de folhas fervidas houve aderência dos eritrócitos ao fundo da placa.

À excepção do *Rumex crispus*, a actividade hemaglutinante dos extractos aumentou devido ao tratamento térmico (Aderibigbe *et al.*, 1997). Como se sabe, a maioria das lectinas são termolábeis, por isso uma das possibilidades para explicar estes resultados poderia dever-se ao facto de existirem na amostra compostos com a acção semelhante à das lectinas, que aumentassem com o tratamento térmico e se manifestassem com aglutinação eritrocitária, o que se torna bastante especulativo. Outra hipótese passa por existirem nas folhas cruas compostos do tipo glicosilados (glicoproteínas) que poderão inibir a acção das lectinas, por estabelecerem ligações com estas, mas que quando sujeitos a temperaturas elevadas possam ser inactivados, degradados ou estabelecer ligação com outras moléculas, resultando na manifestação da actividade das lectinas. Por fim, outra justificação é a de que as lectinas presentes nas folhas cruas encontram-se na forma ligada e após o tratamento térmico exibem a sua libertação (Aderibigbe *et al.*, 1997). Este aumento de actividade hemaglutinante após tratamento térmico, pode também dever-se a artefactos que parecem desaparecer na presença de iões metálicos (Mn^{2+}) (Aregheore *et al.*, 1998).

10.3.3.2. Determinação da inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares

Perante os resultados obtidos anteriormente, realizou-se um ensaio de inibição da actividade hemaglutinante pelos açúcares para as três amostras de folhas (*Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*), sujeitas a tratamento térmico durante 30 min, que provocaram a aglutinação dos eritrócitos. Para cada amostra, incubaram-se 4

U.H. com uma bateria de 16 açúcares de concentração 0,1 M, cada um deles diluído seriadamente de 1:3, com o objectivo de determinar a concentração mínima de açúcar que ainda provoca a inibição da actividade hemaglutinante pelas lectinas, e determinar a classe de especificidade das lectinas aos hidratos de carbono.

A **Figura 28** revela que para as três espécies, todos os açúcares provocaram a inibição da hemaglutinação, até à diluição mínima testada, excepto o ácido *N*-acetil-neuramínico para a *Beta marítima*. Neste caso, na última diluição já não se revelou inibição pelo açúcar (assinalado por seta, na Fig. 28). Com excepção do ácido *N*-acetil-neuramínico, todos os açúcares revelaram ter uma concentração mínima inibitória inferior a $5,65 \times 10^{-7}$ M (c.m.i. < $5,65 \times 10^{-7}$). Assim, pode constatar-se que para todos os extractos que exibem actividade hemaglutinante, basta uma concentração mínima de açúcar para inibir as lectinas presentes nestas folhas e que na sua constituição existem diferentes tipos de lectinas.

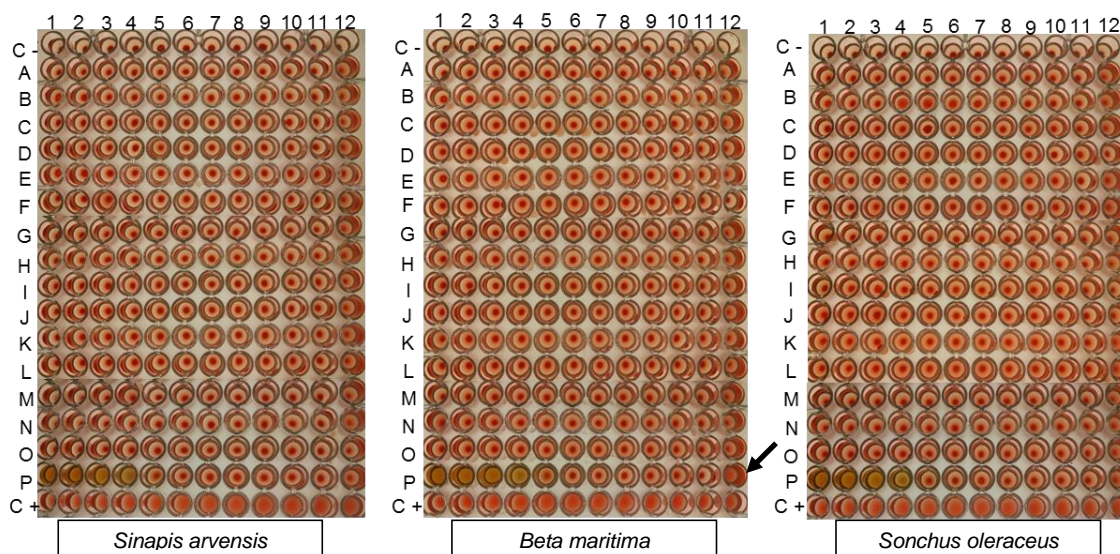


Figura 28. Identificação dos açúcares que inibem a actividade hemaglutinante dos extractos das folhas (*Sinapis arvensis*, *Beta maritima* e *Sonchus oleraceus*), sujeitas a +100 °C durante 30 min. Para todas as amostras, colocaram-se 70 µL de soro fisiológico em todos os poços, em cada linha no 1º poço colocaram-se 70 µL de cada um dos açúcares (0,1 M), diluindo-se seriadamente (1º ao 12º poço) e adicionou-se o extracto proteico (4 U.H.), por poço. Após incubação (1 h à temperatura ambiente) adicionaram-se em todos os poços 70 µL de solução eritrocitária a 4%. Estes resultados foram obtidos após mais uma incubação de 1 h à temperatura ambiente.

C- Soro fisiológico; A- Glucose; B- Glucosamina; C- *N*-acetil-D-glucosamina; D- Galactose; E- Galactosamina; F- *N*-acetil-D-galactosamina; G- Lactose; H- Manose; I- Rafinose; J- L-fucose ; K- Melezitose; L- Metil- α -glucopiranosido; M- Metil- α -manosido; N- Sacarose; O- Maltose; P- Ácido *N*-acetil-neuramínico; C+ - Con-A.

11. Conclusões

Com a realização deste trabalho pretendeu-se fazer uma breve caracterização a nível nutricional e toxicológico de quatro plantas silvestres: *Rumex crispus* (labaça-crespa), *Sinapis arvensis* (mostarda-dos-campos), *Beta maritima* (acelga-brava) e *Sonchus oleraceus* (serralha-macia).

Os estudos de avaliação da composição mineral, demonstraram que as plantas silvestres estudadas se destacam pelos seus elevados níveis de magnésio, ferro e zinco, comparativamente com as espécies cultivadas correspondentes (*Rheum rhabarbarum* (ruibarbo), *Brassica napus* (nabiças), *Beta vulgaris* (acelga-comum) e *Lactuca sativa* (alface)).

A determinação do conteúdo proteico das folhas cruas, revelou que em relação aos produtos hortícolas cultivados (nabiças e acelga-comum), a mostarda-dos-campos (*Sinapis arvensis*) e a acelga-brava (*Beta maritima*) contêm teores superiores na ordem dos 44,3% e 42,6%, respectivamente.

Em relação ao teor fenólico e à capacidade antioxidante, as quatro plantas silvestres utilizadas neste trabalho, apresentaram um elevado teor fenólico (891,55 – 105,84 mg/ 100 g massa seca em EAG) e poder antioxidante, verificando-se uma actividade captadora de radicais de 89,44 – 40,55 %. Este facto demonstra a importância que estes produtos poderão vir a ter na indústria alimentar e farmacêutica devido às suas propriedades antioxidantes.

O *Rumex crispus* não apresentou actividade lectina, tanto nas folhas cruas como nas confeccionadas, concluindo-se que, a nível deste composto antinutricional, não há riscos de consumo desta espécie silvestre. Perante a sua composição mineral, o teor de compostos fenólicos e a actividade antioxidante que são, respectivamente, cerca de 92% e 98% superiores aos valores do ruibarbo (espécie cultivada), pode constatar-se que a planta hortícola silvestre apresenta características importantes para o consumidor muito mais relevantes do que a planta cultivada.

Do ponto de vista toxicológico, a *Sinapis arvensis*, a *Beta maritima* e o *Sonchus oleraceus* contêm lectinas, ainda que inactivas no estado cru, pelo que o seu consumo alimentar não é aconselhado. Estes diferentes extractos quando sujeitos a tratamento térmico (+100 °C), expõem a actividade de lectina. Estes resultados, pela primeira vez evidenciados, traduzem-se em diferentes abordagens destas espécies, relativamente ao estudo dos inibidores de lectinas e em estratégias de purificação de novas lectinas. Actualmente, as lectinas são ferramentas de topo, usadas na glicómica. O seu mecanismo de acção confere-lhes propriedades biológicas, biomédicas e

biotecnológicas. Assim num estudo futuro, poder-se-ia explorar as lectinas destas plantas e o impacto da sua utilização.

Em termos de perspectivas futuras, outros compostos nutricionais e toxicológicos deveriam ser estudados de modo a obter-se uma caracterização mais completa destas espécies. Outra possibilidade a testar, é o desenvolvimento de produtos com funções terapêuticas a baixo custo.

Referências bibliográficas

Abbasi, A.; Khan, M.; Khan, N.; Shah, M. (2013). Ethnobotanical survey of medicinally important wild edible fruits species used by tribal communities of Lesser Himalayas-Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology*, 148: 528-536.

Acosta-Estrada, B.; Gutierrez-Urbe, J.; Serna-Saldivar, S. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152: 46-55.

Aderibigbe, A.; Johnson, C.; Makkar, H.; Becker, K.; Foild, N. (1997). Chemical composition and effect of heat on organic matter- and nitrogen-degradability and some antinutritional components of *Jatropha* meal. *Animal Feed Science Technology*, 67: 223-243.

Agbaire, P. (2011). Nutritional and anti-nutritional levels of some local vegetables (*Vernonia anydalira*, *Manihot esculenta*, *Teifera occidentalis*, *Talinum triangulare*, *Amaranthus spinosus*) from Delta State, Nigeria. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 15: 625-628.

Ambrosi, M.; Cameron, N.; Davis, B. (2005). Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 3: 1593-1608.

Aregheore, E.; Makkar, H.; Becker, K. (1998). Assessment of lectin activity in a toxic and a non-toxic variety of *Jatropha curcas* using latex agglutination and haemagglutination methods and inactivation of lectin by heat treatments. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77: 349-352.

Bah, C.; Fang, E.; Ng, T. (2013). Medicinal Applications of Plant Lectins. In: Fang, E.; Ng, T. *Antitumor Potential and other Emerging Medicinal Properties of Natural Compounds*. 1.^a ed. Springer Science+Business Media Dordrecht: 55-74.

Bartosz, G. (2014). *Food Oxidants and Antioxidants: Chemical, Biological and Functional*. 1.^a ed. Taylor & Francis Group: 568 p.

Batista, C.; Barros, L.; Carvalho, A.; Ferreira, I. (2011). Nutritional and nutraceutical potential of rape (*Brassica napus* L. var. *napus*) and “tranchuda” cabbage (*Brassica oleraceae* L. var. *costata*) inflorescences. *Food and Chemical Toxicology*, 49: 1208-1214.

Belitz, H-D.; Grosch, W.; Schieberle, P. (2009). *Food Chemistry*. 4.^a ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 1070 p.

Berker, K.; Olgun, F.; Ozyurt, D.; Demirata, B.; Apak, R. (2013). Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61: 4783-4791.

Blum, H.; Beier, H.; Gross, H. (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, 8: 93-99.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.; Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und –Technologie*, 28: 25-30.

Brewer, M. (2011). Natural antioxidants: sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10: 221-247.

Buul, V.; Brouns, F. (2014). Health effects of wheat lectins: A review. *Journal of Cereal Science*, 59: 112-117.

Carlsen, M.; Halvorsen, B.; Holte, K.; Bøhn, S.; Dragland, S.; Sampson, L.; Willey, C.; Senoo, H.; Umezono, Y.; Sanada, C.; Barikmo, I.; Berhe, N.; Willett, W.; Phillips, K.; Jacobs Jr, D.; Blomhoff, R. (2010). The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutrition Journal*, 9: 3-13.

Carocho, M.; Ferreira, I. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, 51: 15-25.

Cartea, M.; Francisco, M.; Soengas, P.; Velasco, P. (2011). Phenolic compounds in Brassica vegetables. *Molecules*, 16: 251-280.

Cvjetko, M.; Lepojević, Ž.; Zeković, Z.; Vidović, S.; Milošević, S. (2009). Antioxidant properties of rapeseed. *Zbornik radova Tehnološkog fakulteta, Leskovac*, 19: 27-33.

Dai, J.; Mumper, R. (2010). Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. *Molecules*, 15: 7313-7352.

Danish Food Composition Databank - ed. 7.01. Disponível em: http://www.foodcomp.dk/v7/fcdb_grpsearchres.asp?MainGrp=05. Acesso em: 28/08/2014.

Della, A.; Paraskeva-Hadjichambi, D.; Hadjichambis, A. (2006). An ethnobotanical survey of wild edible plants of Paphos and Larnaca countryside of Cyprus. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 2: 34-42.

Deniaud, D.; Julienne, K.; Gouin, S. (2011). Insights in the rational design of synthetic multivalent glycoconjugates as lectin ligands. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 9: 966-979.

Dogan, Y.; Baslar, S.; Ay, G.; Mert, H. (2004). The use of wild edible plants in Western and Central Anatolia (Turkey). *Economic Botany*, 58: 684-690.

Dudonné, S.; Vitrac, X.; Coutière, P.; Woillez, m.; Mérillon, J. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57: 1768-1774.

Faye, L.; Chrispeels, M. (1985). Characterization of N-linked oligossacharides by affino blotting with concanavalina A-peroxidase and treatment of the blots with glycosides. *Analytical Biochemistry*, 149: 218-224.

Ferreira, I.; Abreu, R. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, 2: 32-39.

Flora-on. Disponível em: <http://www.flora-on.pt>. Acesso em: 28/08/2014.

Gemedé, H.; Ratta, N. (2014). Antinutritional factors in plant foods: potential health benefits and adverse effects. *Global Advanced Research Journal of Food Science and Technology*, 3: 103-117.

Genç, G.; Özhatay, N. (2006). An Ethnobotanical Study In Çatalca (European Part Of Istanbul) II. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3: 73-89.

Getachew, G.; Asfaw, Z.; Singh, V.; Woldu, Z.; Baidu-Forson, J.; Bhattacharya, S. (2013). Dietary values of wild and semi-wild edible plants in southern Ethiopia. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 13: 7485-7503.

Ghirardini, M.; Carli M.; Vecchio N.; Rovati, A.; Cova, O.; Valigi, F.; Agnetti, G.; Macconi, M.; Adamo, D.; Traina, M.; Laudini, F.; Marcheselli, I.; Caruso, N.; Gedda, T.; Donati, F.; Marzadro, A.; Russi, P.; Spaggiari, C.; Bianco, M.; Binda, R.; Barattieri, E.; Tognacci, A.; Girardo, M.; Vaschetti, L.; Caprino, P.; Sesti, E.; Andreozzi, G.; Coletto, E.; Belzer, G.; Pieroni, A. (2007). The importance of a taste. A comparative study on wild food plant consumption in twenty-one local communities in Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 22-35.

Guil, J.; Rodríguez-García, I.; Torija, E. (1997). Nutritional and toxic factors in selected wild edible plants. *Plant Foods for Human Nutrition*, 51: 99-107.

Guil-Guerrero, J. (2014). The safety of edible wild plants: Fuller discussion may be needed. *Journal of Food Composition and Analysis*, 35: 18-20.

Hamid, R.; Masood, A.; Wani, I.; Rafiq, S. (2013). Lectins: Proteins with Diverse Applications. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3: 93-103.

Hanif, R.; Iqbal, Z.; Iqbal, M.; Hanif, S.; Rasheed, M. (2006). Use Of Vegetables As Nutritional Food: Role In Human Health. *Journal of Agricultural and Biological Science*, 1: 18-22.

Ignat, I.; Volf, I.; Popa, V. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126: 1821-1835.

INSA. Disponível em: <http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/AreasCientificas/AlimentNutricao/AplicacoesOnline/TabelaAlimentos/PesquisaOnline/Paginas/PorPalavraChave.aspx>. Acesso em: 28/08/2014.

Jacobs, A.; Dry, I.; Robinson, S. (1999). Induction of different pathogenesis-related cDNA in grapevine infected with powdery mildew and treated with ethephon. *Plant Pathology*, 48: 325-336.

Jardim Botânico da UTAD. Disponível em: <http://jb.utad.pt/>. Acesso em: 28/08/2014.

Jonh, F.; Tabbasum, K.; Rao, C. (2013). Chemico-biological aspects of plant lectins with a preference to legume lectins. In: Atta-ur-Rahman. *Studies in Natural Products Chemistry* – Volume 40. 1.^a ed. Elsevier: 359-378.

Kader, A.; Perkins-Veazie, P.; Lester, G. (2012). Nutritional quality of fruits, nuts, and vegetables and their importance in human health. United States Department of Agriculture. Versão online: <http://www.ba.ars.usda.gov/hb66/nutritionalQuality.pdf>

Kalle, R.; Sõukand, R. (2012). Historical ethnobotanical review of wild edible plants of Estonia (1770s-1960s). *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81: 271-281.

Karnchanatat, A. (2012). *Antimicrobial Activity of Lectins from Plants*. In: Bobbarala, V. Antimicrobial Agents. 1.^a ed. InTech: 145-178.

Kedare, S.; Singh, R. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 412-422.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.

Lam, S.; Ng, T. (2011). Lectins: production and practical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 89: 45-55.

Lentini, F.; Venza, F. (2007). Wild food plants of popular use in Sicily. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 15-26.

Liopa-Tsakalidi, A. (2014). *Scandix pecten-veneris* L.: A wild green leafy vegetable. *Australian Journal of Crop Science*, 8: 103-108.

Lis, H., Sharon, N., 1998. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. *Chemical Reviews*, 98: 637-674.

Litescu, S.; Eremia, S.; Radu, G. (2010). *Methods for the determination of antioxidant capacity in food and raw materials*. In: Giardi, M.; Rea, G.; Berra, B. Bio-Farms for Nutraceuticals: Functional Food and Safety Control by Biosensors. 1.^a Ed. Landes Bioscience and Springer Science+Business Media: 241-248.

Liu, X.; Ardo, S.; Bunning, M.; Parry, J.; Zhou, K.; Stushnoff, C.; Stoniker, F.; Yu, L.; Kendall, P. (2007). Total phenolic content and DPPHd radical scavenging activity of lettuce (*Lactuca sativa* L.) grown in Colorado. *LWT- Food Science and Technology*, 40: 552-557.

Lobo, V.; Patil, A.; Phatak, A.; Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy Reviews*, 4: 118-126.

Loris, R. (2002). Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572: 198-208.

Luczaj, L.; Pieroni, A.; Tardío, J.; Pardo-de-Santayana, M.; Sõukand, R.; Svanberg, I.; Kalle, R. (2012). Wild food plant use in 21st century Europe: the disappearance of old traditions and the search for new cuisines involving wild edibles. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 81: 359-370.

Luzuriaga, A.; Escudero, A.; Pérez-García, F. (2006) Environmental maternal effects on seed morphology and germination in *Sinapis arvensis* (Cruciferae). *Weed Research*, 46: 163-174.

Ma, Z.; Cooper, C.; Kim, H.; Janick-Buckner, D. (2009). A Study of Rubisco through Western Blotting and Tissue Printing Techniques. *CBE—Life Sciences Education*, 8: 140-146.

Mahadkar, S.; Valvi, S.; Rathod, V. (2012). Screening of anti-nutritional factors from some wild edible plants. *Journal of Natural Product and Plant Resources*, 2: 251-255.

Martins, S.; Mussatto, S.; Martínez-Avila, G.; Montañez-Saenz, J.; Aguilar, C.; Teixeira, J. (2011). Bioactive phenolic compounds: production and extraction by solid-state fermentation. A review. *Biotechnology Advances*, 29: 365-373.

Marxen, K.; Vanselow, K.; Lippemeier, S.; Hintze, R.; Ruser, A.; Hansen, U. (2007). Determination of DPPH radical oxidation caused by methanolic extracts of some microalgal species by linear regression analysis of spectrophotometric measurements. *Sensors*, 7: 2080-2095.

Merril, C.; Switzer, R.; Keurent, M. (1979). Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 4335-4339.

Michalak, A. (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. *Polish Journal of Environmental Studies*, 15: 523-530.

Mithril, C.; Dragsted, L. (2012). Safety evaluation of some wild plants in the New Nordic Diet. *Food and Chemical Toxicology*, 50: 4461-4467.

Morales, P.; Ferreira, I.; Carvalho, A.; Sánchez-Mata, M.; Cámara, M.; Fernández-Ruiz, V.; Pardo-de-Santayana, M.; Tardío, J. (2014). Mediterranean non-cultivated vegetables

as dietary sources of compounds with antioxidant and biological activity. *LWT - Food Science and Technology*, 55: 389-396.

Moreira, I.; Vasconcelos, T.; Caixinhas, L.; Espírito Santo, D. (2000). *Ervas daninhas das vinhas e pomares*. 2.^a ed. Direcção-Geral de Protecção das Culturas. 209 p.

Mulligan, G.; Bailey, L. (1975). The biology of Canadian weeds. 8. *Sinapis arvensis* L.. *Canadian Journal of Plant Science*, 55: 171-183.

Müntz, K. (2007). Protein dynamics and proteolysis in plant vacuoles. *Journal of Experimental Botany*, 58: 2391-2407.

Pardo-de-Santayana, M.; Tardío, J.; Morales, R. (2005). The gathering and consumption of wild edible plants in the Campoo (Cantabria, Spain). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 56: 529-542.

Pardo-de-Santayana, M.; Tardío, J.; Blanco, E.; Carvalho, A.; Lastra, J.; Miguel, E.; Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 3: 27-37.

Peumans, W.; Van Damme, E. (1995). The role of lectins in plant defence. *Histochemical Journal*, 27: 253-271.

Pieroni, A. (2000). Medicinal plants and food medicines in the folk traditions of the upper Lucca Province, Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 70: 235-273.

Pieroni, A.; Nebel, S.; Quave, C.; Münz, H.; Heinrich, M. (2002). Ethnopharmacology of liakra: traditional weedy vegetables of the Arbëreshë of the Vulture area in southern Italy. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 165-185.

Pourmorad, F.; HosseiniMehr, S.; Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 11: 1142-1145.

Prior, R.; Wu, X.; Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 4290-4302.

Proestos, C.; Lytoudi, K.; Mavromelanidou, O.; Zoumpoulakis, P.; Sinanoglou, V. (2013). Antioxidant capacity of selected plant extracts and their essential oils. *Antioxidants*, 2: 11-22.

Pyo, Y.; Lee, T.; Logendra, L.; Rosen, R. (2004). Antioxidant activity and phenolic compounds of Swiss chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*) extracts. *Food Chemistry*, 85: 19-26.

Ribeiro, A. (2008). Análise molecular de lectinas em sementes de leguminosas. Lisboa: Universidade de Lisboa – Faculdade de Farmácia. 238 p. Tese de Doutoramento em Bromatologia.

Rocha, F. (1996). *Nomes vulgares de plantas existentes em Portugal*. Ed. especial. Direcção-Geral de Protecção das Culturas. 591 p.

Roginsky, V.; Lissi, E. (2005). Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, 92: 235-254.

Rufino, M.; Alves, R.; Brito, E.; Morais, S.; Sampaio, C.; Pérez-Jiménez, J.; Saura-Calixto, F. (2006). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Embrapa Agroindústria Tropical*. Comunicado Técnico, 125.

Scherrer, A.; Motti, R.; Weckerle, C. (2005). Traditional plant use in the areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). *Journal of Ethnopharmacology*, 97: 129-143.

Seifu, D.; Assefa, F.; Abay, S. (2012). Medicinal plants as antioxidant agents: Understanding their mechanism of action and therapeutic efficacy. *Research Signpost*, 37/661: 97-145.

Sharon, N.; Lis, H. (1990). Legume lectins – a large family of homologous proteins. *The FASEB Journal*, 4: 3198-3208.

Shetty, K.; Paliyath, G.; Pometto, A.; Levin, R. (2006). *Food Biotechnology*. 2.^a ed. Taylor & Francis Group: 2008 p.

Silva, E.; Souza, J.; Rogez, H.; Rees, J.; Larondelle, Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101: 1012-1018.

Silva, M.; Corrêa, A.; Santos, C.; Marcos, F.; Abreu, C. (2010). Extração da lectina da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) e o efeito de cátions divalentes na atividade hemaglutinante. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 30: 103-107.

Sim, K.; Nurestri, A.; Norhanom, A. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. *Pharmacognosy Magazine*, 23: 248-254.

Singleton, V.; Rossi, J. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16: 144-158.

Smith, J.; Hong-Shum, L. (2003). *Food Additives Data Book*. 1.^a ed. Blackwell Science: 1016 p.

Sochor, J.; Ryvolova, M.; Krystofova, O.; Sala, P.; Hubalek, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Havel, L.; Beklova, M.; Zehnalek, J.; Provaznik, I.; Kizek, R. (2010). Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: advantages and disadvantages. *Molecules*, 15: 8618-8640.

Sousa, C.; Silva, H.; Vieira-Jr., G.; Ayres, M.; Costa, C.; Araújo, D.; Cavalcante, L.; Barros, E.; Araújo, P.; Brandão, M.; Chaves, M. (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30: 351-355.

Stahl, W.; Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular Aspects of Medicine*, 24: 345-351.

Stipanuk, M.; Caudill, M. (2013). *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*. 3.^a ed. Elsevier Saunders: 968 p.

Swain, T.; Hillis, W. E. (1959). The phenolic constituents of *Prunus domestica* 1. The quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 10: 63-68.

Tabaraki, R.; Ghadiri, F. (2013). In vitro antioxidant activities of aqueous and methanolic extracts of *Smyrniurn cordifolium* Boiss and *Sinapis arvensis* L.. *International Food Research Journal*, 20: 2111-2115.

Tardío, J.; Pardo-de-Santayana, M.; Morales, R. (2006). Ethnobotanical review of wild edible plants in Spain. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 152: 27-71.

Thaipong, K.; Boonprakob, U.; Crosby, K.; Cisneros-Zevallos, L.; Byrne, D. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant

activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19: 669-675.

USDA. Disponível em: <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/>. Acesso em: 28/08/2014.

Valagão, M. (2006). *Tradição e Inovação Alimentar. Dos recursos silvestres aos itinerários turísticos*. 1.^a ed. Edições Colibri/ INIAP: 269 p.

Vandecasteele, C.; Block, C. (1993). *Modern methods for trace element determination*. John Wiley & Sons, Ltd: 330 p.

Vandenborre, G.; Smagghe, G.; Van Damme, E. (2011). Plant lectins as defense proteins against phytophagous insects. *Phytochemistry*, 72: 1538-1550.

Varrot, A.; Blanchard, B.; Imberty, A. (2011). Lectin binding and its structural basis. In: Wang, B.; Boons, G. *Carbohydrate Recognition: Biological Problems, Methods, and Applications*. 1.^aed. John Wiley & Sons: 329-348.

Vasconcelos, I.; Oliveira, J. (2004). Antinutritional properties of plant lectins. *Toxicon*, 44: 385-403.

Vasconcelos, T.; Portugal, J.; Moreira, I. (2000). *Flora infestante das culturas de sequeiro do Alentejo*. 1.^aed. Escola Superior Agrária de Beja: 143 p.

Vasta, G.; Ahmed, H.; Nita-Lazar, M.; Banerjee, A.; Pasek, M.; Shridhar, S.; Guha, P.; Fernández-Robledo, J. (2012). Galectins as self/non-self recognition receptors in innate and adaptive immunity: an unresolved paradox. *Frontiers in Immunology*, 199: 1-14.

Vladimir-Knežević, S.; Blažeković, B.; Štefan, M.; Babac, M. (2012). *Plant polyphenols as antioxidants influencing the human health*. In: Rao, V. *Phytochemicals as Nutraceuticals - Global Approaches to Their Role in Nutrition and Health*. 1.^a Ed. InTech: 155-180.

Wegiera, M.; Grabarczyk, P.; Baraniak, B.; Smolarz, H. (2011). Antiradical properties of extracts from roots, leaves and fruits of six *Rumex* L. species. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 53: 125–131.

Wink, M. (2005). *Health promoting activities of non-nutricional factors in lupins*. Proceedings of the 11th International Lupin Conference, Guadalajara, Jalisco, Mexico. 308-319.

World Health Organization. (2002). *The world health report 2002 – Reducing risks, promoting healthy life*. Geneva: 230 p.

World Health Organization. (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: Report of a joint Who/Fao expert consultation, Geneva 2003*. WHO technical report series; 916.

Yıldırım, A.; Mavi, A.; Kara, A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 4083-4089.

Anexos I

Gráficos e respectivas equações referentes às curvas padrão dos ensaios dos compostos fenólicos totais (**Figura 29**), actividade captadora de radicais DPPH (**Figura 30**) e poder redutor (**Figura 31**).

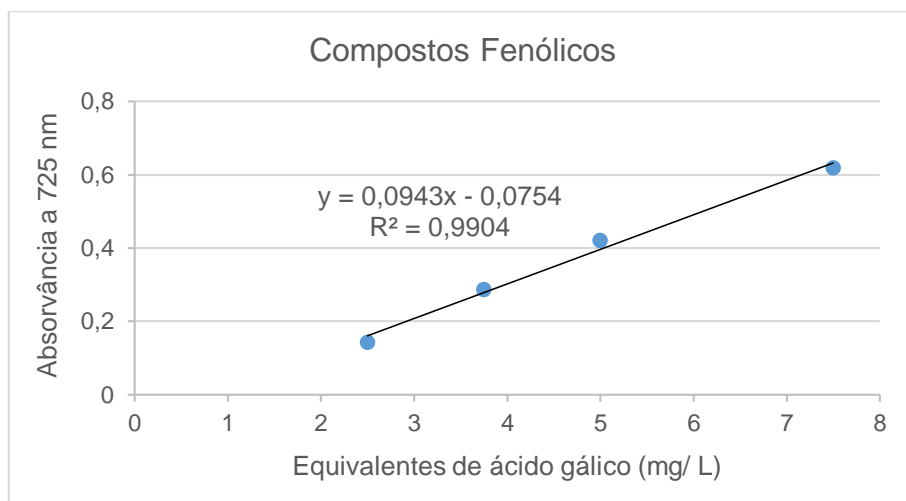


Figura 29. Curvas de calibração para determinação do teor de compostos fenólicos totais

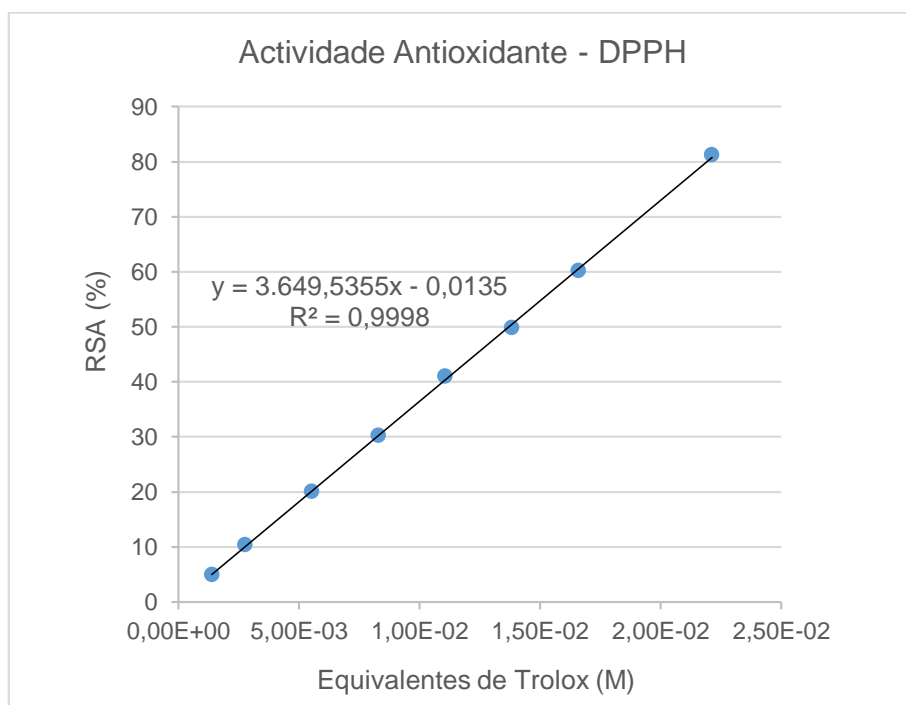


Figura 30. Curva de calibração para determinação da actividade antioxidante pela capacidade de captação de radicais DPPH

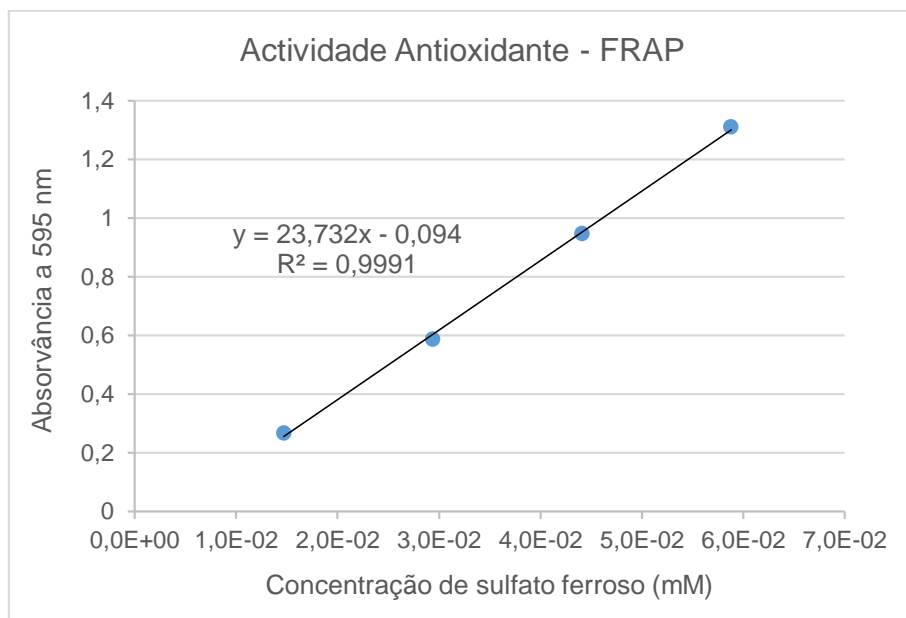


Figura 31. Curva de calibração para determinação da actividade antioxidante pelo método do poder redutor

Anexos II

Gráficos e respectivas equações referentes às curvas padrão das determinações das concentrações proteicas dos extractos crus (**Figura 32**) e sujeitos a uma temperatura de +100 °C (**Figura 33**) pelo método de Bradford.

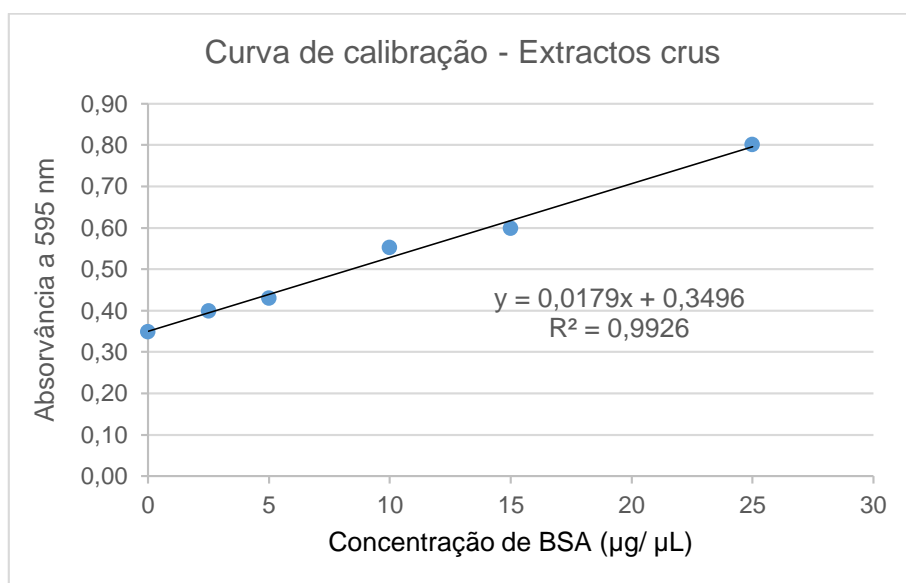


Figura 32. Curva de calibração para a determinação da concentração proteica dos extractos crus

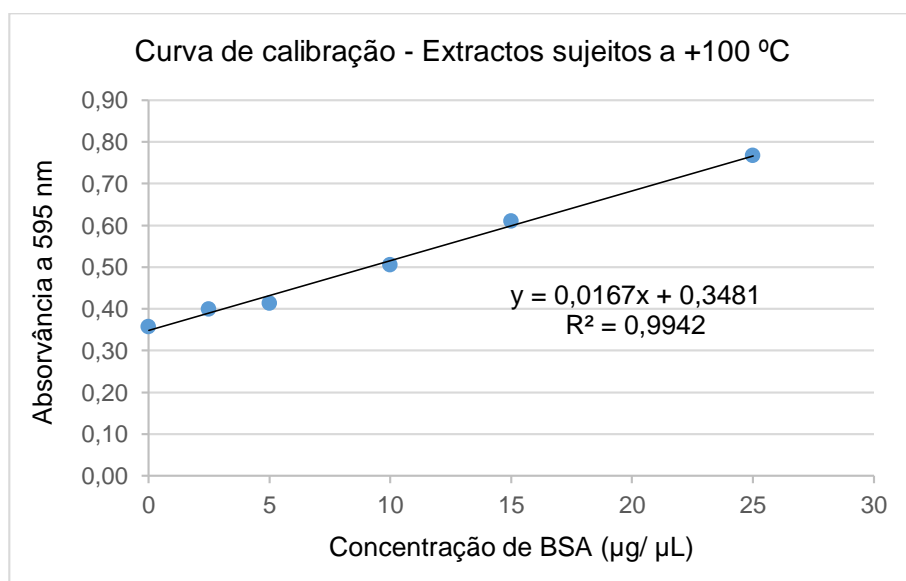


Figura 33. Curva de calibração para determinação da concentração proteica dos extractos sujeitos a +100 °C.